

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：	15501
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590334
研究課題名（和文）	マルチパラメータ解析技術を利用した腫瘍マーカーの網羅的解析
研究課題名（英文）	High-throughput tumor-related gene expression analysis in various cell lines.
研究代表者	
	近藤 智子（古屋 智子）（KONDO (FURUYA) TOMOKO）
	山口大学・大学院医学系研究科・助教
	研究者番号：30379979

### 研究成果の概要（和文）：

多種類の細胞の細胞内物質を同時に測定する目的で作成したセルアレイシステムを使用して多数の腫瘍由来培養細胞における各種腫瘍マーカーやがん関連遺伝子の発現レベルの網羅的な解析を行った。20種類の培養細胞について、24種類の細胞内物質の発現レベルを解析し、その結果をもとに腫瘍分類を試みたところ、得られたデータは既存の由来組織による分類を支持するものではあったが、従来と異なった視点からの新分類を見出すには至らなかった。

### 研究成果の概要（英文）：

We analyzed expression level of tumor makers in many cell lines by 'cell array system' which we developed for high content analysis. The expression level of 24 kinds of intracellular molecules was measured in various cell lines by Laser scanning cytometer (LSC). We tried novel classification of tumors based on the data we obtained, but we did not succeed.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：イメージサイトメトリー、腫瘍マーカー、セルアレイ、網羅的解析

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞内では遺伝子や蛋白質をはじめとする遺伝子産物が密接に関連し細胞活動を支えている。それぞれの細胞は連携し、組織さらには臓器としての機能を発揮している。従来、分子生物学では生命活動解明のため、

個々の細胞内物質について生化学的な手法で分子レベルまでおとして解析していたが、現在ではそれらの物質が生命の基本単位である細胞のどこで(局在)どのくらい(定量)みとめられ、どのような他の分子と連携しているのか(相互関係)といった細胞レベル

での解析が求められている(サイトミクス, cytomics, G.Valet et al. Cytometry part A. 59A: 167-171, 2004)。蛍光物質の使用、測定機器の高機能化にともなって細胞レベルでの物質解析が行われるようになってきたが、実際の細胞内では非常に多数の遺伝子や蛋白質が複雑に関係しあっており、その相互作用までの解明を目指すのであれば、多数物質の同時(同条件での)解析(マルチパラメーター解析)が必要である。また多角的な解析のためには対象とする検体も数種類では不十分であり、多数検体を対象にした網羅的解析も必要となる。つまり生命活動解明のためには「一度に多数の検体に対して、多数パラメータを各細胞において短時間で解析可能とし、細胞形態を含めて対象とする分子の細胞内での局在とその量、さらには分子間相互の関係を明らかにできる、ハイコンテンツ技術 (high-content analysis 技術 (HCA技術))」による解析が求められているのである。さて、腫瘍細胞における各種腫瘍マーカーやがん関連遺伝子の発現については、多くの報告がなされており、その研究成果の中には実際に臨床にも応用されているものもある。しかしながら腫瘍マーカーの発現については定性的な報告が多く、がん関連遺伝子の発現についても解析する遺伝子は数種類、測定対象の細胞も2, 3種類にとどまるものが多く、多種類の遺伝子産物について多種類の細胞を対象に網羅的に測定、解析した結果は現在までにその報告はない。腫瘍マーカーやがん関連遺伝子の発現を、多数種類のがん細胞について網羅的に解析することは、それらにより詳細な機能解明につながるとともに、個々のがん細胞の性質についても詳細に評価することが可能となる。さらには得られた結果をもとに発生部位や組織型といった従来の分類とはちがったアプローチからのがんの分類を試みることも可能であり、がん研究へ新たな視点を提供することが期待される。そこで本研究課題では申請者自身が今までに開発してきたHCA技術であるセルアレイシステム (Am. J. Pathol; 157(3): 723-728, 2000, Cytometry A;55:24-29, 2003) を用いて、腫瘍マーカーおよびがん関連遺伝子の網羅的解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究は「独自に開発したマルチパラメーター解析技術を用いて、がん細胞における腫瘍マーカーやがん関連遺伝子産物を多種類のがん細胞について網羅的に解析し、遺伝子発現レベルからの新たな腫瘍の分類を試み

る」ことを目指した研究である。

## 3. 研究の方法

### (1)セルアレイの作製

本研究課題では各種腫瘍由来培養細胞における腫瘍マーカー発現を網羅的に解析するために申請者らが独自に開発した「セルアレイ」システムを使用した。セルアレイは図1に示す通りスライドガラス上に直径2mmのスポットを50個ならべたもので、それぞれのスポットに異なる種類の細胞を貼り付ければ最大50種類の細胞を1枚のセルアレイに貼り付けることができる。

トリプシン処理等で培養細胞を個々ばらばらにし、各細胞それぞれ5スポットに貼り付けることにした。つまり1枚のセルアレイに10種類の細胞を貼り付けた。10種類の細胞のうち2種類はコントロール細胞としてヒト胎児由来線維芽細胞(TIG-7)と子宮頸がん由来のHeLa細胞を使用した。セルアレイを作製するにあたってはセルアレイ用に作製した自動スポッターを使用した。

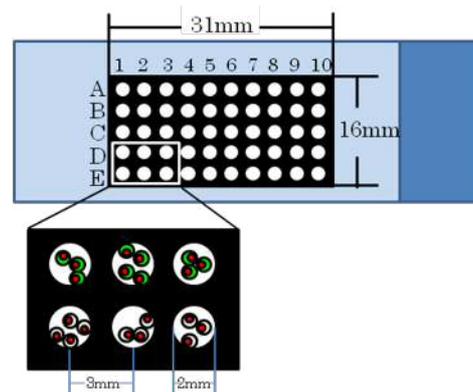


図1 セルアレイシステムの概要

### (2)各種腫瘍マーカーの蛍光免疫染色

腫瘍マーカーは上皮マーカー、間葉系マーカー、リンパ球マーカーなど病理診断で日常的に使用されているものを中心に選んだ。その他にはがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子産物のうち代表的なものを選んだ。これらのターゲット分子に対して間接法による蛍光免疫染色を行った。本研究では二次抗体はすべてAlexa 488®で標識した。蛍光免疫染色後はRNase処理を行い、ヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide, PI) で細胞核を染色した。

### (3)レーザースキャニングサイトメーター (LSC)による解析

蛍光免疫染色を行ったセルアレイスライドはLSCによりターゲット分子の細胞内発現量を定量した。LSCではスキャン範囲の測定対象(細胞)のDNA量、免疫染色の蛍光強度だけでなく、それぞれの位置(スライド上の

座標)情報を同時に取得できるので、多種類の細胞を貼り付けたセルスライドグラスでも、細胞種ごとに測定する必要はなく、スライド全範囲を一度にスキャン、測定した後にセルアレイの個々のスポットごとにデータを取り出すことができる。データを取り出す範囲は自由に設定できるので、たとえば5個のスポットに同じ細胞を貼り付けた場合も5スポット分のデータを一緒にして解析可能である。

#### 4. 研究成果

##### (1)セルアレイ作成時の問題点およびその解決

検討する腫瘍由来細胞は計画では 50 種類としていたが、実際には 20 種類の培養細胞で検討した。当初の計画より検討する細胞の種類が予定数に満たなかった理由はセルアレイ作成過程におけるサンプル調整に問題が生じたためである。セルアレイスライドグラス上に細胞を貼り付け際には独自で開発したセルアレイスポッター(図2)を使用した。手作業でのスポッティングと比較して労力は格段に減少した。しかしクラスターを作りやすい細胞や免疫染色時にはがれやすい細胞についてはサンプル調整の最適化が必要であり、トリプシン処理時間や細胞濃度の調整、固定前のメッシュ処理でのクラスター除去を行うこと等で他の細胞と同様にスポッターでスポッティングできるようにした。



図2 セルアレイ標本自動作製機の全体図。これに制御用コンピュータが必要

##### (2)LSCでの細胞内物質の測定

LSCで細胞内物質を測定した際のLSCディスプレイの一例を図3に示す。3. 研究の方法で述べたとおりLSCでセルアレイスライド全体を一度に測定したのちにゲートをかけ、目的とする細胞のみのデータを抽出し解析できる。

このように各細胞のデータはサイトグラム、ヒストグラムとしてあらわすことができるが、細胞ひとつひとつのデータ(座標、蛍光量等)をリストモードとして取り出すことができる。

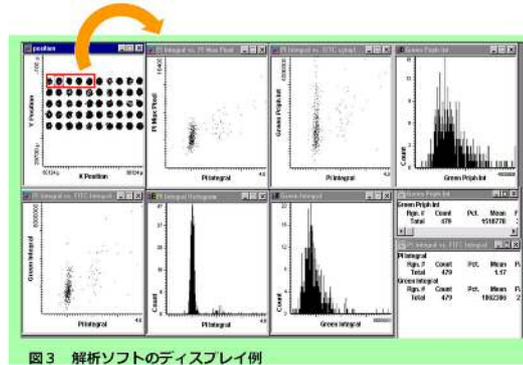


図3 解析ソフトのディスプレイ例

各細胞における腫瘍マーカー発現レベル一覧表の一部を掲載する(表1)。各腫瘍マーカー発現レベルは正常細胞(TIG-7細胞)を1としたときの相対的な発現レベルである。このデータを下に階層解析を行ったところ、由来組織や組織型による分類を支持するものではあったが、新たな視点による分類を見出すにはいたらなかった。これは検討したマーカーや腫瘍細胞の種類が少なかったことが理由のひとつとして考えられる。また、発現レベルを測定した細胞集団全体の最頻値(蛍光強度を横軸にとったヒストグラムでピークを示す蛍光強度)としたが、細胞内局在を考慮、あるいは細胞周期のある時点(たとえばG1期のみ)での発現レベルで比較するといった複数の解析アプローチが必要であったかもしれない。

今後もさらに多くの腫瘍マーカー、細胞種でのデータを増やし研究を継続する予定であるが、データ数の増加や、複数の解析アプローチでの検討を考慮し、バイオインフォマティクス研究者と連携することを考えている。

表1 各培養細胞における腫瘍マーカー発現レベル(一部データ)

腫瘍マーカー	D1D-1	CW-2	MS-1	I/OVO	O10320D	GBC2TK	HeLa	SO-5	PG-3(腎)
DL	0.84	0.85	1.08	1.06	1.16	1.22	1.29	1.28	1.18
CK	2.5	3.4	0.6	1.8	0.5	1.3	1	2.5	5.3
CEA	0.9	1.2	0.8	1.4	1	1.3	1.4	1.4	2.4
p53	1.3	1.3	3.5	1.2	1.1	1.3	1.2	1.3	1.8
EMA	1.1	1.3	0.9	1.4	1	2.8	1.7	7.7	17.2
Desmin	1.1	1.6	0.7	1.6	1.1	1.5	1.7	1.6	1.6
L-26	2.3	3.3	1.5	1.3	2.4	3.5	9.6	2.4	2.3
LCA	1.1	1.4	1.1	1.1	1.3	1.4	2.1	1.5	1.5
MDM2	1.1	1.3	1.3	1.3	1.5	2	1.5	1.4	2.1
p21	0.9	1.3	1.1	1.4	1	1.5	1.6	1.6	1.4
BAK	0.8	2.8	1.7	1.1	1.8	2.2	2.7	4.1	2.9
c-Met	0.8	1	1.4	0.9	1.2	1.1	1.3	1.3	1.8
PTEN	1	1.9	1.2	0.9	1	3.2	1.9	3.3	1
p16	0.5	0.9	1.1	0.9	1.1	1.4	1.4	2.8	1.5
BCL-2	0.7	1.4	0.8	0.9	0.8	1.9	1.9	1.1	1.1
c-jun	0.9	1.6	1.1	1.1	1.1	2.2	2.5	1.9	1.8
EGFR	1.2	2	1	1.2	1.3	2.2	2.2	1.8	1.9
TGFBR	0.9	1.9	1.2	1.1	2.3	2.1	3.6	1.5	1.5
cMYC	1.1	1.6	0.8	1	1.4	1.7	1.5	1.7	1.1
Cyclin D1	0.9	1.4	0.8	0.8	0.9	1.7	2.1	1.7	1.3
HER	1.2	1.7	0.8	1.1	1.1	1.9	2.3	1.8	1.8
c-erbB-2	1.1	2.2	0.8	1	0.8	2	1.7	1.6	1.5
Cyclin D1	0.9	1.9	0.6	1.2	0.7	1.9	1.7	1.6	1.3

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Misumi T, Yamamoto Y, Miyachika Y, Eguchi S, Chochi Y, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. DNA

- copy number aberrations associated with lymphovascular invasion in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Genet.* (査読有) 2012;205(6): 313-318. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.04.008.
- ② Yanagawa M, Ikemoto K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, Oga A, Nagashima Y, Sasaki K. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes.* (査読有) 2012; 25;5:376. doi: 10.1186/1756-0500-5-376.
- ③ Xu JD, Cao XX, Long ZW, Liu XP, Furuya T, Xu JW, Liu XL, De Xu Z, Sasaki K, Li QQ. BCL2L10 protein regulates apoptosis/proliferation through differential pathways in gastric cancer cells. *J Pathol.* (査読有) 2011;223(3):400-409. doi: 10.3892/or.2011.1246. Epub 2011 Apr 5.
- ④ Kawauchi S, Furuya T, Nakao M, Ikemoto K, Oga A, Sasaki K. A simple method for enhancing hybridization efficiency in chromosome and array comparative genomic hybridization. *Biotech Histochem.* (査読有) 2011;86(3): 192-198. doi: 10.3109/10520291003666781. Epub 2010 Mar 16.
- ⑤ Nakao M, Kawauchi S, Uchiyama T, Acachi J, Ito H, Chochi Y, Furuya T, Oga A, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncology report.* (査読有) 2011; 25; 1603-1611 doi:10.3892/or.2011.1246
- ⑥ Yamamoto Y, Misumi T, Eguchi S, Chochi Y, Kitahara S, Nakao M, Nagao K, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Centrosome amplification as a putative prognostic biomarker for the classification of urothelial carcinomas. *Hum Pathol.* (査読有) 2011; 42(12); 1923-1930. doi: 10.1016/j.humpath.2011.02.013. Epub 2011 Jun 17.
- ⑦ Oga A, Uchida K, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ikemoto K, Okada T, Ueyama Y, Sasaki K, Yousefpour F. Loss of 6q or 8p23 is associated with the total number of DNA copy number aberrations in adenoid cystic carcinoma. *Oncol Rep.* (査読有) 2011; 23(6): 1393-1398. doi: 10.3892/or.2011.1446. Epub 2011 Sep 5.
- ⑧ Kawauchi S, Furuya T, Ikemoto K, Nakao M, Yamamoto S, Oka M, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with aneuploidy and chromosomal instability in breast cancers. *Oncol Rep.* (査読有) 2010;24(4):875-883
- ⑨ Xu JD, Furuya T, Cao XX, Liu XL, Li QQ, Wang WJ, Xu ZD, Sasaki K, Liu XP. Loss of BCL2L10 protein expression as prognostic predictor for poor clinical outcome in gastric carcinoma. *Histopathology.* (査読有) 2010; 57(6): 814-824. doi: 10.1002/path.2811. Epub 2010 Nov 22.
- [学会発表] (計3件)
- ① 古屋智子、伊藤秀明、帖地康世、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典、各種乳癌培養細胞に対する12q15領域にコードされる遺伝子産物の影響、第101回日本病理学会総会、平成24年4月27日、東京、京王プラザホテル
- ② 古屋智子、河内茂人、帖地康世、伊藤秀明、小賀厚徳、佐々木功典、乳癌におけるDNAコピー数異常領域に存在する遺伝子産物の乳癌培養細胞に対する影響についての検討、第100回日本病理学会総会、平成23年4月29日、横浜、パシフィック横浜
- ③ 古屋智子、河内茂人、帖地康世、小賀厚徳、佐々木功典、乳癌におけるDNAコピー数異常と各種マーカーの発現との関連について、第99回日本病理学会総会、平成22年4月29日、東京、京王プラザホテル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 智子 (古屋 智子) (KONDO (FURUYA) TOMOKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30379979