

鳥谷 慎之介

(指導教員：川井恵一教授、小林正和助教)

要旨：腫瘍診断用放射性医薬品開発において、放射性画像診断薬の組織集積と標的分子の発現量との相関性に関心が高まっている。そこで本研究では、ヒト腫瘍細胞におけるトランスポーターなどの機能性分子の発現を網羅的に観察するため、リファレンス RNA により標準化したデータベースを構築するとともにその信頼性を確認した。

16 種類のヒト培養腫瘍細胞の遺伝子発現レベルを Agilent 社製の DNA チップを用いた DNA マイクロアレイ法により解析した。また、これまで行ってきた遺伝子発現解析結果の信頼性を確認するために、新たなヒト培養細胞および摘出組織試料の解析にあたり、リファレンス RNA を用いて標準化した。委託業者である DNA チップ研究所にも同一試料の解析を依頼し、両解析結果の近似曲線の相関係数を求めて比較した。

異なるスキャナにより計測されたデータを用いて解析した遺伝子発現レベルを比較した結果、すべての測定試料において相関係数は 0.98 以上と非常に高い相関性が得られ、本法の信頼性が確認できた。この解析方法をこれまで測定してきたマイクロアレイ法による測定結果に適用し、直接比較可能なデータベースを構築した。

このように、リファレンス RNA を用いて標準化することにより、直接比較可能なデータベースが構築できた。今後、この標準化によるデータを蓄積することにより、特定機能性分子の遺伝子発現プロファイリングがすべての試料に対して可能となった。

I. はじめに

腫瘍診断用放射性医薬品開発において、放射性画像診断薬の組織集積と標的分子の発現量との相関性に関心が高まっている¹⁻³⁾。標的分子の発現量を観察することで放射性画像診断薬の集積機序の検討、酵素や受容体との結合など機能性分子の相互作用メカニズムの評価ができ、放射性画像診断薬の有用性の検討を行うことができる。

本研究室では標的分子の遺伝子発現量を調べるためにマイクロアレイによる解析を行い、リファレンスとしてはその都度適したものを使用して標準化を行っていた。しかし、異なる細胞由来の RNA で標準化したデータは直接比較できないため、直接比較が可能で標的分子の発現量を網羅的に観察できるデータベースが必要であると考えた。このデータベース構築のためには、測定値の標準化、マイクロアレイスキャナ依存性および解析パラメータが問題となる。そこで本研究では、ヒトリファレンス RNA により標準化し、スキャナ依存性が影響しないような統一された解析パラメータで解析を行うことで、ヒト腫瘍細胞におけるトランスポーターなどの機能性分子の発現を網羅的に観察できるデータベースを構築するとともに、その信頼性を確認した。

II. 実験方法

16 種類のヒト培養腫瘍細胞(表皮癌:A431、膵臓癌:ASPC1、前立腺癌:DU145, PC3, LNCap, MDA-Pca, 22Rv1、肺癌:H441, PC14, H1975, H3255、大腸癌:LS180, DLD1、乳癌:MDA-MB、正常膵臓:Pancreas、正常前立腺細胞:PrEc)の遺伝子発現レベルをマイクロアレイにより解析した。

解析には Gene Spring GX10.0.2 を用い、解析パラメータとしてマイクロアレイから読みとった測定値を 75 パーセントイルで標準化し、さらに同一リファレンスで標準化を行うように統一した。標準化には 10 種類の細胞株の RNA から構成され、ロット間の差が少ない Stratagene 社製のヒトリファレンス RNA を使用した。マイクロアレイスキャナ依存性を解決するため、金沢大学と DNA チップ研究所の異なるスキャナで読み取った同一試料の測定値を、前述した条件で解析した。その解析結果の信頼性の確認のため、得られた 4 万 4 千個のデータから任意に抽出した 1 万個において、金沢大学のデータと DNA チップ研究所のデータの相関図を作成し、近似曲線から、傾きと相関係数を求めた。さらに、本解析法を過去に行ったマイクロアレイによる測定結果に適用することで直接比較可能なデータベースを構築した。

III. 結果と考察

作成した相関図の一部を Fig. 1 に示す。

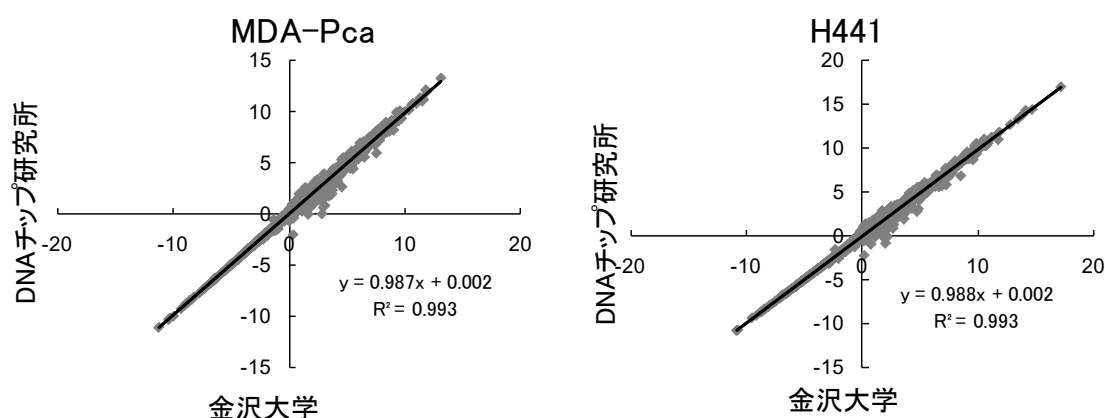


Fig.1 遺伝子発現量相関図

異なるスキャナにより計測した測定値を用いて解析した遺伝子発現レベルを比較した結果、全測定試料について傾きと相関係数が 0.98 以上の高い相関が得られ、本法の信頼性が確認できた。過去に行ったマイクロアレイによる測定結果に本解析法を適用することで直接比較可能なデータベースが構築できた。また、Gene Spring GX10.0.2 により解析されたデータは、エクセルファイルとして保存できるため、本法により構築したデータベースを用いることにより、目的の遺伝子情報を容易に検索、抽出することが可能となった。構築したデータベースの遺伝子情報を検索し、アミノ酸トランスポーターについてまとめたものを Table.1 に示す。今回解析した培養細胞について、アミノ酸トランスポーターに関する情報が一挙に取得、比較が可能となった。また、高発現しているトランスポーターからその細胞に適した放射性医薬品の検討を行うこともでき、組織集積と比較することで輸送経路の検討も網羅的に行うことが可能となった。さらに、データベースを検索することで他の機能性分子についてもプロファイリングが可能となった。

一方、このような遺伝子発現データベースの活用法として、同一測定試料の形質変換について検討した。本研究室(A 施設)と本大学大学院自然科学研究科薬学系薬物動態学研究室(B 施設)で継代してきた生育環境が異なる膵臓癌: ASPC1 と大腸癌: LS180 の遺伝子発現レベルを任意に抽出した 1 万個のデータについて比較したものを Fig.2 に示す。

Table.1 マイクロアレイによるアミノ酸トランスポーターの遺伝子発現解析

Annotation			発現変動															
	Transport system	Gene aliases	22Rv1	A431	ASPC1	DL1	DU145	H1975	H3255	H441	LNCap	LS180	MDA-MB	MDA-Pca	Pancreas	PC14	PC3	PrEC
			中性 アミノ酸	A	ATA/ NAT2	0.778	1.233	2.285	1.056	0.561	0.463	0.581	0.938	0.262	0.383	1.760	1.942	0.736
	1.102	1.148			2.601	0.993	0.799	0.327	0.643	1.128	0.235	1.022	1.491	2.739	0.670	0.553	1.205	1.940
ATA2	0.883	0.448			0.597	0.252	0.380	0.434	0.253	0.319	0.151	0.190	0.906	0.600	0.267	0.835	0.896	1.658
	1.272	1.022			1.236	0.436	0.788	0.985	0.517	0.654	0.295	0.382	1.306	0.706	0.354	1.740	1.374	2.705
ATA3/ NAT3	0.430	0.148			8.708	0.129	0.187	0.208	0.491	0.298	0.190	0.491	0.757	0.234	1.337	0.143	0.173	0.215
	0.331	0.286		2.822	0.248	0.366	0.294	0.364	0.587	0.377	0.389	0.327	0.453	0.845	0.268	0.335	0.427	
NAT1	0.478	3.860		3.273	1.068	1.664	2.641	3.229	1.407	0.917	0.252	2.639	0.352	0.223	2.324	4.566	0.514	
GLY	GLYT1	3.770		5.004	0.735	0.889	1.631	2.679	0.522	4.089	0.742	0.938	3.292	2.626	22.566	1.305	1.779	6.156
	GLYT2	0.545		0.575	0.481	0.464	0.287	0.697	0.664	0.693	0.419	0.470	0.609	0.426	6.721	0.836	0.260	0.298
ASC	ASCT1	1.193		1.355	0.730	2.204	0.424	0.429	0.516	3.487	0.380	1.036	2.435	2.273	1.091	0.432	0.631	4.346
		1.463		0.644	0.217	0.687	0.189	0.090	0.258	1.360	0.230	0.395	1.324	1.486	2.265	0.174	0.442	1.494
	ASCT2	1.759		3.536	1.786	3.197	1.240	0.996	2.649	1.860	0.897	2.097	5.262	4.639	0.696	0.896	0.837	4.693
N	SN1	0.358		0.285	0.062	0.246	0.115	0.208	0.454	0.100	0.266	0.249	0.189	0.109	18.033	0.254	0.057	0.213
	SN2	0.038		10.941	0.042	0.027	0.022	0.076	0.025	5.275	0.027	0.037	0.018	0.037	11.454	0.019	0.045	1.032
β	Taut	0.075		0.348	0.907	1.424	1.416	0.599	0.420	0.157	0.100	0.398	2.014	0.065	0.362	0.829	0.709	0.040
		0.397		1.102	5.097	4.482	2.363	1.857	1.808	0.723	1.018	2.622	1.991	0.701	1.380	2.296	1.489	0.690
B^{0+}	ATB ⁰⁺	0.013		0.047	0.014	0.010	0.034	0.083	1.883	0.023	0.014	1.302	0.013	0.018	0.031	0.023	0.013	0.144
		0.092		0.080	0.102	0.064	0.101	0.083	0.892	0.164	0.104	0.850	0.091	0.127	0.236	0.074	0.093	0.119
γ^L	γ^L LAT1	0.225		0.167	1.042	36.136	0.286	2.814	0.342	0.184	0.120	46.218	0.488	0.143	6.877	36.885	0.222	0.206
		0.413		1.882	2.381	6.190	2.308	2.491	2.459	0.572	1.026	3.589	2.654	0.904	1.515	2.559	1.445	0.648
	γ^L LAT2	1.094	0.618	0.872	0.378	1.338	0.744	0.631	1.012	0.656	0.694	2.233	0.783	0.636	1.235	0.955	1.016	
	0.521	0.942	1.040	0.859	0.988	1.489	0.834	0.931	0.485	1.220	2.314	0.506	0.201	1.381	0.672	1.927		
L	LAT1	0.903	2.700	3.437	1.946	0.900	0.806	0.295	7.329	0.086	1.197	2.073	2.498	0.716	0.244	0.244	6.033	
		0.800	4.981	3.335	1.930	0.842	1.162	0.230	11.428	0.058	1.693	2.629	3.203	0.175	0.166	0.301	7.926	
	LAT2	0.215	0.540	0.019	5.148	0.020	0.016	0.014	2.500	1.351	1.309	0.018	0.568	0.745	0.014	0.018	2.665	
	LAT3	3.666	0.193	0.512	1.988	0.407	0.173	0.250	0.669	5.880	5.427	2.670	23.845	92.562	0.753	2.306	0.325	
	LAT4	0.484	0.106	0.175	0.117	0.782	0.887	0.807	0.182	1.010	0.569	0.171	1.554	1.304	0.057	0.849	0.400	
T	TAT1	0.517	0.116	0.150	1.995	0.464	0.343	1.454	3.366	2.178	0.159	1.576	1.222	4.290	0.332	1.084	0.360	
b^{0+}	BAT1	0.751	0.166	0.217	0.184	0.212	0.172	0.152	0.337	0.242	0.227	0.195	0.259	0.822	0.156	0.195	0.250	
asc	asc1	0.206	0.065	0.084	0.050	0.083	0.067	0.059	0.134	0.085	0.086	0.076	0.247	1.120	0.059	0.076	0.096	
塩基性 アミノ酸	B^{0+}	ATB ⁰⁺	0.013	0.047	0.014	0.010	0.034	0.083	1.883	0.023	0.014	1.302	0.013	0.018	0.031	0.023	0.013	0.144
			0.092	0.080	0.102	0.064	0.101	0.083	0.892	0.164	0.104	0.850	0.091	0.127	0.236	0.074	0.093	0.119
	γ^+	CAT1	1.197	1.193	0.859	0.870	0.937	0.666	0.127	1.483	0.800	1.287	2.211	2.012	1.738	0.492	0.269	1.521
			3.291	2.714	2.699	3.873	1.931	1.641	0.566	3.369	1.909	3.963	5.396	5.475	4.018	2.404	0.690	4.682
		CAT2	0.775	0.262	0.504	0.527	0.333	0.271	0.241	0.537	0.342	0.342	0.531	0.419	3.859	0.243	0.303	0.393
		CAT3	0.085	0.080	0.033	0.020	0.088	0.027	0.029	0.062	0.079	0.065	0.067	0.115	0.630	0.052	0.030	0.039
	CAT4	0.765	0.295	0.344	0.291	0.968	0.286	0.254	0.568	0.522	0.391	0.650	0.709	3.303	0.507	0.375	4.700	
	γ^L	γ^L LAT1	0.225	0.167	1.042	36.136	0.286	2.814	0.342	0.184	0.120	46.218	0.488	0.143	6.877	36.885	0.222	0.206
			0.413	1.882	2.381	6.190	2.308	2.491	2.459	0.572	1.026	3.589	2.654	0.904	1.515	2.559	1.445	0.648
		γ^L LAT2	1.094	0.618	0.872	0.378	1.338	0.744	0.631	1.012	0.656	0.694	2.233	0.783	0.636	1.235	0.955	1.016
	0.521	0.942	1.040	0.859	0.988	1.489	0.834	0.931	0.485	1.220	2.314	0.506	0.201	1.381	0.672	1.927		
b^{0+}	BAT1	0.751	0.166	0.217	0.184	0.212	0.172	0.152	0.337	0.242	0.227	0.195	0.259	0.822	0.156	0.195	0.250	
酸性 アミノ酸	X_{AG}	EAAT1	0.336	1.218	0.029	1.519	0.065	0.018	0.014	0.318	0.046	0.047	0.063	0.010	0.128	0.067	0.149	0.106
			0.466	3.346	0.212	7.092	0.171	0.140	0.119	0.582	0.175	0.317	0.155	0.214	0.513	0.126	0.362	0.199
		EAAT2	0.046	0.040	0.053	0.084	0.052	0.043	0.038	0.083	0.110	0.055	0.048	0.065	9.823	0.039	0.048	0.061
			0.062	0.028	0.039	0.022	0.036	0.078	0.025	0.058	0.037	0.038	0.057	0.044	2.249	0.048	0.033	0.076
		EAAT3/ EAAC1	4.708	0.068	25.486	6.871	1.247	0.479	0.982	0.391	5.732	7.740	1.300	0.312	1.128	2.401	2.015	0.133
	EAAT4	0.067	0.058	0.073	0.047	0.074	0.060	0.053	0.119	0.076	0.079	0.067	0.093	0.172	0.055	0.068	0.087	
	EAAT5	0.238	0.138	0.426	0.227	0.257	0.197	28.787	0.250	0.194	0.571	0.354	0.169	2.294	0.288	1.012	0.157	
	X_C	xCT	1.217	2.038	0.890	0.988	0.553	0.260	0.417	0.994	0.178	0.815	4.150	3.466	0.467	1.192	0.806	3.199
			2.473	2.847	1.201	3.266	0.760	0.287	0.865	1.174	0.661	0.608	7.128	8.000	0.830	1.252	1.951	4.419
			4.027	5.172	2.316	2.738	1.352	0.841	1.077	2.379	0.578	1.755	9.643	8.219	1.788	2.770	1.671	6.586
アミノ酸トランスポーター活性化因子	L_{γ}^L	1.842	4.682	2.744	4.237	1.335	1.080	0.528	9.485	0.731	1.946	4.483	4.374	3.017	0.637	1.067	7.700	
	asc, X_r	1.591	4.646	2.619	4.273	1.236	1.076	0.471	9.681	0.681	1.939	4.619	3.945	1.506	0.560	0.938	7.862	
	b^{0+}	rBAT	3.827	1.008	715.605	5.759	9.660	0.932	1.113	1.537	2.286	1.451	3.667	0.474	1996.933	1.794	2.661	3.162

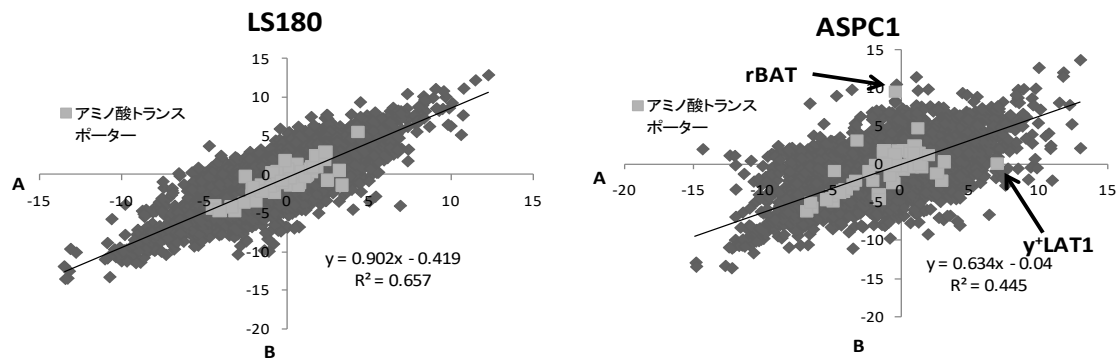


Fig.2 生育環境の異なる細胞の遺伝子発現量相関図

LS180 では両施設で高い相関性が得られたが、ASPC1 では LS180 に比べ相関が低く、いくつかの遺伝子発現について、突出した値を示したことから、形質変換を起こしていることが確認された。特に、アミノ酸トランスポーターに関しても、B 施設においては y^+LAT1 が、A 施設においては活性化因子である rBAT が高発現していることが確認できた。このように、データベースを用いて比較することにより、生育環境の違いによる細胞の形質変換についても容易に比較検討することが可能となった。

IV. 結語

リファレンス RNA を用いて標準化し、統一された解析パラメータで解析することにより直接比較可能なデータベースが構築できた。今後この標準化によるデータを蓄積することにより、他の腫瘍細胞とも比較が可能となり、特定の機能性分子の発現形態に基づくプロファイリングが可能となった。

V. 謝辞

本研究にあたり、ご指導いただいた川井恵一教授、小林正和助教、ご協力いただいた滋賀県立成人病センター研究所の西井龍一先生、本大学医薬保健研究域薬学系中西猛夫准教授、本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) C. Forstner, J. Egbert, O. Ammerpohl, D. Niedzielska, R. Buchert, P. Mikecz, U. Schumacher, K. Peldschous, G. Adam, C. Pilarsky, R. Grutzmann, H. Kalthoff, E. Henze, W. Brenner. Gene expression patterns and tumor uptake of ^{18}F -FLT, and ^{18}F -FEC in PET/MRI of an orthotopic mouse xenotransplantation model of pancreatic cancer. *J Nucl Med*, 2008;49:1362-1370.
- 2) C. Haase, R. Bergmann, F. Fuechtner, A. Hoepping, J. Pietzsch. L-Type amino acid transporters LAT1 and LAT4 in cancer: Uptake of 3-O-methyl-6- ^{18}F -fluoro-L-dopa in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in vitro and in vitro. *J Nucl Med*, 2007;48:2063-2071.
- 3) X. C. Nguyen, Y. So, J-H Chang, W. W. Lee, S. Y. Park, S. E. Kim. High correlations between primary tumors and loco-regional metastatic lymph nodes in non-small-cell lung cancer with respect to glucose transporter type 1-mediated 2-deoxy-2- ^{18}F -fluoro-D-glucose uptake. *Eur J Cancer*, 2008;44:692-698.