

メッセンジャー・スケープ (HiCEP) 解析を用いた 「すい臓がんマーカー探索」の試み

再現性・感度および網羅性に優れた遺伝子発現プロファイリング方法であるメッセンジャー・スケープ (HiCEP) 解析を用いて、ヒトすい臓がんマーカー探索の試みを行いました。その結果、既知がん関連遺伝子以外に複数の新規マーカー候補を検出しました。本稿では、その概要を報告いたします。

【はじめに】

すい臓がんは、画像診断などによる早期発見が困難なことや、浸潤や転移が早い時期に起こること、さらには予後が極めて悪いこと (切除不能症例では5年生存率がほぼゼロと推計) などから、より確実な早期発見手法の開発が急務とされています。このような状況から、近年盛んに議論されている「バイオマーカー探索」においても、「すい臓がんマーカー」を、そのターゲットとしている例も見られます。弊社においても、メッセンジャー・スケープ (HiCEP) 解析において、この「すい臓がんマーカー」の候補を探索する試みを行いました。具体的には、由来する個人がすべて異なる11検体のすい臓がんサンプル (がん組織) と2検体のすい管サンプル (正常組織) の遺伝子転写産物を直接比較することで、これまでに知られていない「すい臓がんマーカー候補」が取得できる可能性を検討しました。加えて、多数のヒト試料において本解析を行い、個体差を越えた本質的な遺伝子発現変動を本解析法にて検出できるか否かの検討も行いました。

【実験方法】

市販ヒトすい臓がん組織由来トータル RNA (11検体) および市販ヒト正常すい管組織由来トータル RNA (2検体) を解析サンプル (1 μ g) とし、メッセンジャー・スケープ社において受託解析に用いている方法で HiCEP 解析を行いました。各試料より得られた結果は、すべてのサンプルについて一度にシグナル強度補正 (Similarity 法) を行い、相互の発現量比較を行いました。

【解析結果および考察】

正常組織・がん組織に由来する転写産物をメッセンジャー・スケープ (HiCEP) 解析により比較した結果、それぞれのサンプルにおいて約38,000の転写産物 (= 遺伝子) を検出することが出来ました。また、図1に示すように、個々のサンプルでの発現量には個体間で差異が認めら

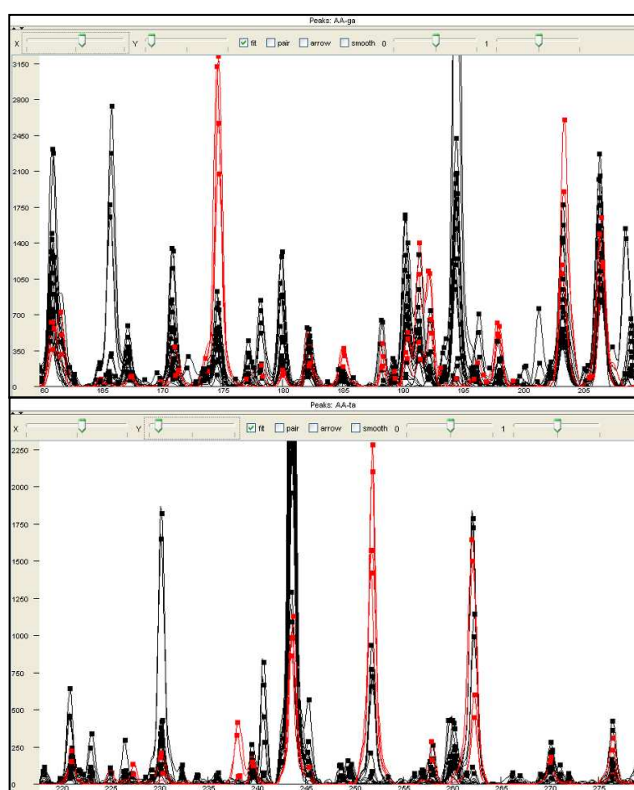


図1 HiCEP 解析結果例

正常すい管組織由来サンプル (2 サンプル: 赤シンボル)、すい臓がん組織由来サンプル (11 サンプル: 黒シンボル) を独立に2回解析し、全データを重ね書きした。

れるものの、HiCEP フラグメント鎖長はほぼ一致しており、正常組織とがん組織では多くの遺伝子が共通して発現していることがわかりました。このような結果から、正常組織・がん組織間での遺伝子転写産物の発現変化を直接比較することが可能であると考えられました。

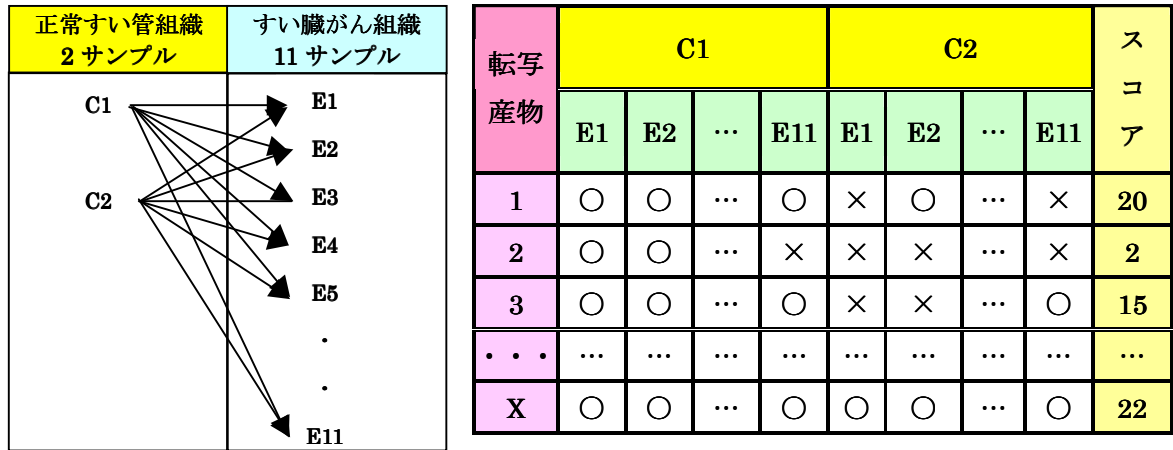


図2 発現変動の評価 (スコアリング模式図)

そこで、正常組織で観察された各転写産物について、それと同じフラグメント鎖長を持つがん組織由来転写産物との発現量の差異を確認しました。具体的には、正常組織で観察された特定の転写産物について注目し、それががん組織由来サンプルにおいて発現差を生じているかを、図2に示す方法で個別別に検討しました。この方法では、がん組織（11検体）ですべて発現変動が確認で

きた場合は、スコア22となり、まったく発現差が確認できない場合はスコア0となります。さらに、その発現差の閾値を3倍・5倍などと変化させることで、全体の発現パターンがより明確になるものと考えられます。

このような解析を行った結果を図3にまとめました。検討したがん組織由来サンプルの半数以上で3倍以上の発現差を確認できた転写産物数は、がん組織での増加・減少とも約700ありました（スコア12以上）。さらに、より確実に個体差との関連が否定できる可能性の高い転写産物の発現変動（増加および減少）は、3倍以上の変動を基準にすると約90転写産物をとらえることができました（スコア20以上）。これを5倍以上の発現変動差を持つ転写産物に限ると、33転写産物が増加、64転写産物が減少するという結果となりました。これには、すい臓がん組織由来サンプルにのみ検出された16転写産物（図4）および正常組織由来サンプルのみで検出された41転写産物も含まれています。これらの結果は、「すい臓がんマーカー」候補と考えられる遺伝子転写産物を、本解析技術の持つ特徴でもある「多サンプルの同時一括解析」を用いて、効率的に絞り込むことが可能であることを示しています。

このようにして絞り込んだ「すい臓がんマーカー」候補転写産物については、それぞれの塩基配列を決定することで、既知の転写産物との異動を明らかにしました。この同定結果から、がん組織由来サンプルにのみ発現が見られた16転写産物に注目すると、図5に示すように、7転写産物が既に「がん」との何らかの関連が報告されており、機能は知られているが「がん」との直接的関連が報告されていない4転写産物、さらに機能が不明な5転写産物が存在するという内訳になりました。

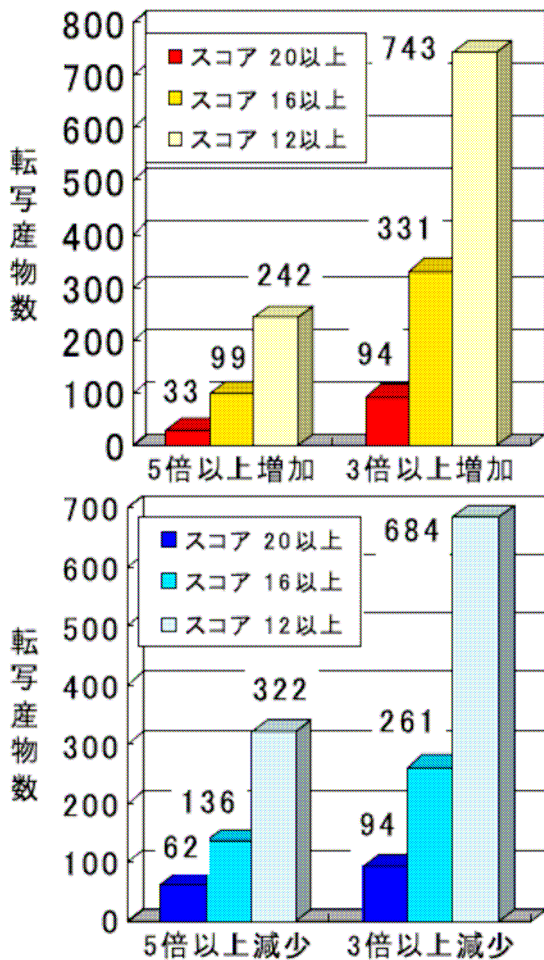


図3 すい臓がんが発現変動する転写産物数

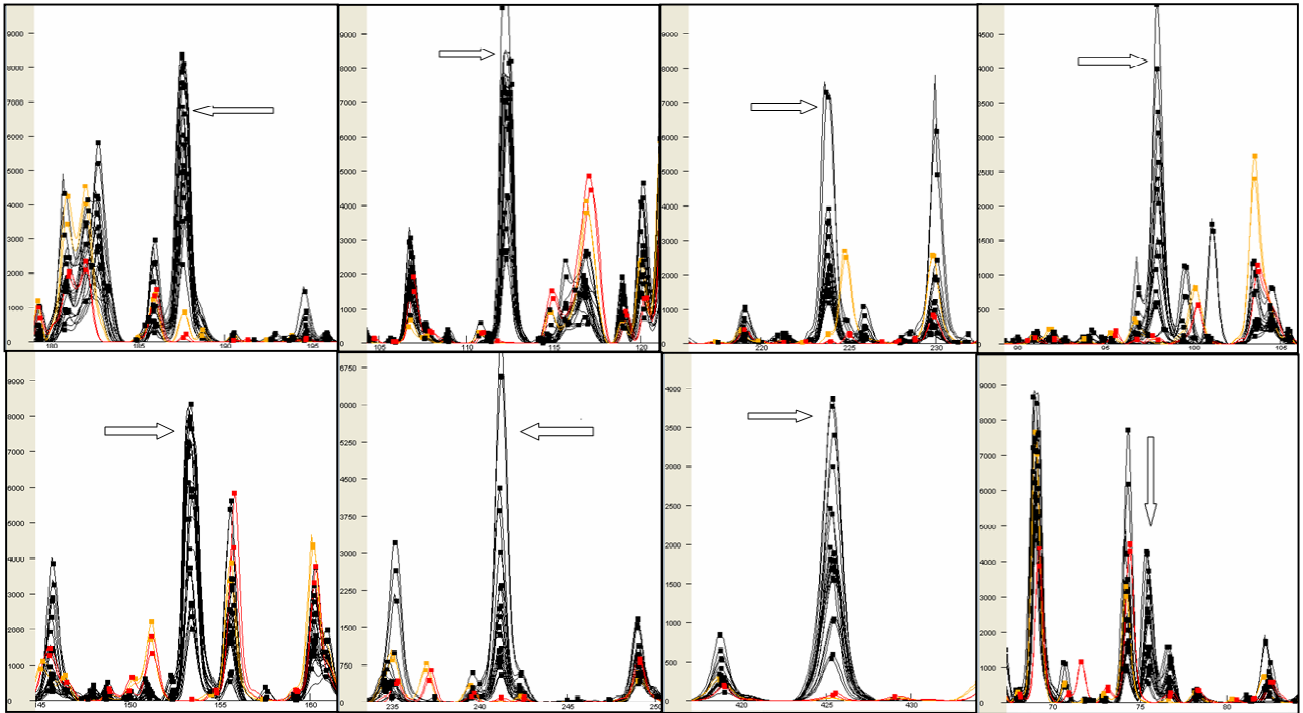


図4 すい臓がん組織でのみ発現が確認された転写産物のHiCEP解析例

正常すい管組織由来サンプル（2サンプル：赤シンボル）、すい臓がん組織由来サンプル（11サンプル：黒シンボル）を独立に2回解析し、全データを重ね書きした。

これらのうち、特に「がん」との関連が知られていない4転写産物と5個の未知転写産物は、当初の目的である新規の「すい臓がんマーカー」としての候補になりえるものと考えられます。これら9転写産物が新規のがんマーカーとなる可能性が高いことは、「がん」との関連が既に知られている7転写産物のうちに、すい臓や内臓がんの特異的マーカーと位置付けられているADAM9やTFF2などが含まれておりますことから示唆されます。ただし、実際にマーカーという位置づけを与えるためには、さらに多くの検体による検証が必要と考えております。

ここに示しました例のように、メッセージャー・スケープ（HiCEP）解析を用いることで、既知の遺伝子を新たなバイオマーカー（候補）として捉えなおすことが可能となるだけでなく、未知の遺伝子（あるいは既知遺伝子の新規バリエント）をも新たなバイオマーカー（候補）とする可能性が広がることをご確認いただけるものと思えます。同時に、多サンプルの一括比較が可能な本解析法は、個体差を越えて本質的に疾患などと関連する遺伝子の探索に極めて有用であると考えられます。

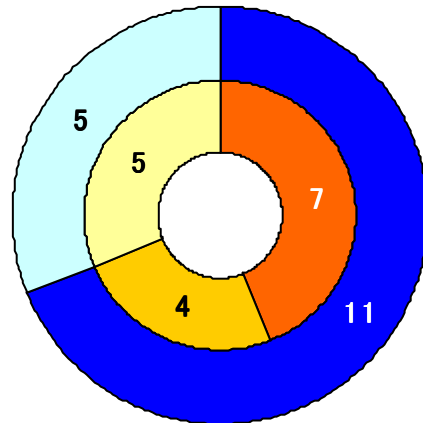


図5 すい臓がんでのみ発現が確認された転写産物の分類

外円：転写産物同定結果

既知転写産物 (■)

新規転写産物

【既知遺伝子の新規バリエントを含む】

(□)

内円：がん関連性検索結果

がん関連既知 (■)

がん関連未知 (■)

機能未知 (■)

本技術情報の詳細につきましては、メッセンジャー・スケープ株式会社、または販売代理店にお問合せください。

メッセンジャー・スケープ株式会社

〒151-0072

東京都渋谷区幡ヶ谷 3-20-2 TS ビル 101

TEL : 03-5333-9805 FAX : 03-3378-7247

<http://www.mscape.co.jp>

info@mscape.co.jp

販売代理店 :