

氏名	杉井 裕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第5335号
学位授与の日付	平成28年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Identification of cell surface markers from multidimensional microarray data utilizing spherical Self Organizing Maps (球面自己組織化マップを用いたマイクロアレイデータ解析による細胞表面マーカーの同定)
論文審査委員	教授 妹尾 昌治 教授 徳光 浩 教授 大槻 高史

学位論文内容の要旨

本研究では、細胞と組織での遺伝子発現プロファイルによって遺伝子をクラスタリングするために、非階層クラスタリング手法である球面自己組織化マップ(球面SOM)を利用した。さまざまなタイプのがん細胞と正常組織を分析することで、分子マーカーとして利用可能な細胞表面分子を発見することを目的とし、膜結合タンパク質をコードする1,795種類のヒト遺伝子に対応するマイクロアレイを作製した。

はじめにヒトグリオーマの細胞表面特異的な分子を探索する目的で、9種類のヒトグリオーマ由来細胞株と成人と胎児の正常脳のcDNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。成人と胎児に対して別々にデータフィルタリングを行った結果、成人では1,174、胎児では179の遺伝子が候補として考えられた。これらの遺伝子に対して球面SOMでクラスタリング解析を行い、遺伝子の発現レベルは球面マップ上に表示することで可視化した。この結果から、同じ正常脳でも成人と胎児では異なる発現パターンが認められる一方で、グリオーマに関しては互いの発現パターンが類似することが判った。

さらに9種すべてのがん細胞株で高発現している遺伝子を探索する目的で、1,174と179の遺伝子のそれぞれ別々に仮定の遺伝子を加えて球面SOM解析を実行した。この仮定遺伝子は、この研究で解析されたすべてのグリオーマ細胞株で発現しているが、正常な成人脳や胎児脳では発現していない理想点IPを表し、このIPに近い位置にクラスタリングされた遺伝子を潜在的なグリオーマの診断マーカーとした。球面SOMクラスタリングの結果、IPは9種すべてのがん細胞株では球面上の高発現の領域に、正常な成人脳や胎児脳では低発現の領域に配置されて可視化された。クラスタリングされた遺伝子のグループは球面SOM表面上の各点に対応しており、IPに近い位置に配置された点、すなわち、クラスタリングされた候補遺伝子を抽出した。この中でCD44やCaveolin-1遺伝子などは、リアルタイムPCRや免疫染色の結果、グリオーマでの発現は認められるが正常脳での発現は認められなかったため、グリオーマに特異的なマーカー遺伝子として同定した。

次に7種の乳がん細胞株と正常乳腺とを比較し、乳がん細胞株に共通して特異的に発現している遺伝子の抽出を試みた。データフィルタリングの結果、840の遺伝子が候補として考えられたため、これらの遺伝子に対して同様に球面SOMでクラスタリング解析を行った。遺伝子発現レベルは、球面マップ上と細胞をその起源で分類する樹状図で可視化した。

また7種すべてのがん細胞株で高発現している遺伝子を探すため、840の遺伝子に仮定の遺伝子IPを加えて球面SOM解析を実行した結果、IPは7種すべてのがん細胞株で球面上の高発現の領域に、正常乳腺組織では低発現の領域に配置されて可視化された。候補遺伝子を抽出した結果、ErbB3、ROBO2およびMUC1は潜在的な診断マーカー候補としての報告が出ているため、抽出されたこの他の遺伝子も、新規な乳がんの診断マーカー候補に成り得ると考えられた。

本研究の結果、細胞表面マーカーマイクロアレイおよびsSOMによるデータの高次解析を行うことで、グリオーマでは新規細胞表面マーカーの同定を可能にした。さらに乳がんにおけるクラスター解析による分類の結果は、治療予後に基づいたサブタイプとの関連性を示唆するものであり、sSOMによるマイクロアレイの解析が遺伝子の発現プロファイルを解析する上で有用であることを示した。

論文審査結果の要旨

一般にDNAマイクロアレイ解析にはクラスター分析が用いられている。しかし、マイクロアレイから得られる多数の遺伝子発現情報を処理するデータマイニングの一般的な手法は未だ確立されていない。本論文では、細胞と組織での遺伝子発現プロファイルによって遺伝子をクラスタリングするために、非階層クラスタリング手法である球面自己組織化マップ (sSOM) を採用している。まず細胞表面特異的な分子を探索する目的で膜結合タンパク質をコードするヒト遺伝子に対応するマイクロアレイを作製し、ヒト脳腫瘍の細胞表面特異的な分子を探索する目的で、9種類の脳腫瘍由来細胞株と成人と胎児の正常脳と比較している。候補として抽出した複数の遺伝子に対して球面SOMでクラスタリングを行った結果、脳腫瘍同士では発現パターンが類似することが示された。さらに、対象としたすべてのがん細胞株で共通に高発現している遺伝子を探索したところ、CD44やCaveolin-1遺伝子を始めとする複数の遺伝子をマーカー遺伝子として抽出した。リアルタイムPCRや免疫染色の結果、正常脳での顕著な発現は認められなかったため、脳腫瘍に特異的なマーカー遺伝子として同定できたと結論した。次に7種の乳がん細胞株と正常乳腺細胞とを比較し、乳がん細胞株に共通して特異的に発現している遺伝子の抽出を試みた。遺伝子発現プロファイルからsSOMにより、予後が悪い細胞、中程度の予後の細胞および予後が良い細胞がそれぞれ同じグループに分類され、診断結果に対応していることが示され、すべてのがん細胞株で高発現している遺伝子としてErbB3、ROBO2およびMUC1が抽出された。これらは潜在的な診断マーカー候補として報告されている。以上より、細胞表面マーカーマイクロアレイを用いてsSOMによるデータの高度解析を行うことで、脳腫瘍では新規細胞表面マーカーを同定するとともに、乳がん細胞の解析による分類の結果は、予後に基づいたサブタイプとの関連性を示すことができた。このようにマイクロアレイデータのsSOM解析が遺伝子の発現プロファイルを解析する上で有用であることを示し、本方法が細胞株から腫瘍組織細胞への解析へと応用を拡大させることにより、実用性を発揮させることが可能であり、将来のがん治療戦略や診断への応用が期待できるものとして有望であると認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。