

週間隔レジメンでの投与回数は、海外の術前化学療法臨床試験で用いられている 12 回投与に設定した³⁾。

HER2 過剰発現例に対しては、抗癌剤との併用による腫瘍縮小効果の増強を期待して trastuzumab⁶⁾を paclitaxel 1 週間隔投与に併用することとした。

なお、本臨床試験は国立がんセンター中央病院 乳腺グループによる院内研究である。

1) 評価項目

(a) 主評価指標

病理学的完全寛解率

(b) 副評価指標

臨床的奏効率(導入部の化学療法終了時およびすべての化学療法終了時)、乳房温存術施行率、手術拒否例の無増悪生存期間、有害事象発生率

2) 対象症例

(a) Disease characteristics

・組織診(core needle biopsy)で乳癌と診断された症例

・臨床病期 (AJCC 2002 年⁷⁾) II 期または IIIa, b 期で次のいずれかに該当する症例

－腫瘍径 2cm 以上 3cm 未満で臨床的に腋窩リンパ節転移陽性と判断できる症例

－腫瘍径 3cm 以上の症例

－大きさを問わず、胸壁または皮膚に直接浸潤が及ぶもの

・原発巣のホルモン受容体は、以下に示す症例を適格とする。

－ER あるいは PgR のいずれか一方のみ陽性

－ER および PgR が共に陰性

(b) Patient characteristics

・年齢：65 才以上の症例

・PS (ECOG) 0-2 の症例

・以下にあげる諸臓器機能を有する症例

－骨髄機能

白血球数 3,000/mm³ 以上または好中球数 1,500/mm³ 以上

血小板 100,000/mm³ 以上

－肝機能

AST(GOT)および ALT(GPT)

60 IU/L 以下

総ビリルビン 1.5mg/dl 以下

－腎機能

血清クレアチニン 1.5mg/dl 以下

－心機能

心電図で正常又は治療を必要としない程度の変化

・本人より文書による同意 (Informed Consent) が得られた症例

3) 治療内容

1) HER2 過剰発現なしの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)

を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

2) HER2 過剰発現ありの症例

Paclitaxel 80 mg/m² 60 分点滴静注 (day 1, 8, 15, 22, 29, 36)

Trastuzumab 4 mg/kg 60 分点滴静注 (day 1)

2 mg/kg 60 分点滴静注

(day 8, 15, 22, 29, 36)

を 6 週 1 コースとして 2 コース施行

4) 予定症例数

予定登録症例数：40 例

登録期間 1 年、追跡期間：登録終了後 1 年、

総研究期間：2 年

5) 倫理面への配慮

本臨床試験では以下の倫理面に配慮し計

画された。

(a) 研究の対象とする個人の人権の擁護

- ・説明文書を渡して十分に説明した上で同意の得られた患者だけを対象とする。
- ・同意を得られない場合は他の治療により最善を尽くすことを保証する。
- ・同意した後いつでも同意を撤回できることを知らせる。
- ・同意されない場合でも不利益を受けないこと。
- ・プライバシーは保護されること。

(b) 被験者に同意を求め理解を得る方法

臨床試験の意味を十分に説明し、理解を求める。

- ・臨床試験がよりよい治療を目指すためにおこなわれること。
- ・最先端の医療を受けられること。
- ・新しい治療法は科学性と倫理性が十分に検討された上で「臨床試験」という形で行われること。

以上を説明する。

(c) 研究により生じる個人への不利益と医学上の利益または貢献度の予測

臨床試験で行われる治療が必ずしも標準的治療よりも良い結果をもたらすとは限らない可能性があること。

医学上の利益・貢献度に関しては本試験で行われる治療法は我が国では先駆的な治療法であり、今後の乳癌の治療成績の向上を目指すための大切な試験であると考えられる。

C. 研究結果

本臨床試験計画は、平成 15 年 1 月 31 日 国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。

平成 15 年 2 月 1 日より登録開始し、平成 16 年 3 月 31 日現在までのところ、登録例は 5 例である trastuzumab 併用は 2 例であった。5 例中 4 例で外科的切除を終了した。4 例の病理組織学的効果（日本乳癌学会乳癌取り扱い規約第 14 版）は、Grade3 : 1 例、Grade2 : 0 例、Grade1b : 0 例、Grade1a : 2 例、Grade0 : 0 例、判定不能 : 1 例であった。現時点までの病理学的完全寛解率は 20% である。

なお、本試験に登録された 5 例は、すべて DNA アレイ解析の同意が得られた。

D. 考察

今回、高齢者の手術可能乳癌の治療成績の向上を目指し、術前化学療法において高い病理学的寛解率が得られる可能性があり、また有害事象の頻度および程度がより軽度な可能性のある化学療法レジメンを用いた臨床試験を計画した。

登録開始より約 1 年経過したが、登録症例数は 5 例で、試験計画時の 1 年の症例集積期間で予定症例数 40 例を集積することが困難であった。このため、予定集積期間を 2 年へ延長した。

なお、5 例中 2 例が trastuzumab 併用例であった。治療効果に関しては、病理学的完全寛解率は 20% (1/5) であった。また、1 例は治療開始後、大腸癌による腸閉塞のため試験を中止したため、判定不能となった。症例数が少ないため、現時点の治療の評価は妥当ではないと考える。

現時点で、試験中止は、食欲不振にて治療を 5 クールで中止した症例と治療開始後、2 クール目で大腸癌による腸閉塞を併発した症例の併せて 2 例である。

今後、治療の安全性について十分に配慮

し、試験登録を推進する予定である。症例登録を重ねることにより、本臨床研究の附属研究である治療前後の乳癌組織および正常組織(末梢血単核球あるいは手術時切除標本の正常組織部)における各種遺伝子発現量検討し、効果・副作用を予測するマーカー遺伝子の検討を行う基礎研究の活性化をはかって行きたい。

E. 結論

高齢者の手術可能な原発性乳癌に対する術前化学療法においてパクリタキセル週 1 回投与(HER2 過剰発現例にはトラスツズマブを併用)による術前化学療法の病理学的完全寛解率を評価する第 II 相臨床試験を計画したが、科学および倫理面を十分に考慮した臨床試験を遂行することが可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

引用文献

- 1) Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al: Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J Clin Oncol 15:2483-2493, 1997
- 2) Hage JA, Velde CJH, Julien JP, et al:

Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 10902, J Clin Oncol 19:4224-4237, 2001

3) Green MC, Buzdar AU, Smith T, et al: Weekly (wkly) paclitaxel (P) followed by FAC as primary systemic chemotherapy (PSC) of operable breast cancer improves pathologic complete remission (pCR) rates when compared to every 3-week (Q 3 wk) P therapy (tx) followed by FAC- final results of a prospective phase III randomized trial. Proc Am Soc Clin Oncol 21:35a, 2002(abstr135)

4) Smith IC, Heys SD, Hutcheon AW, et al: Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: Significantly Enhanced Response With Docetaxel. J Clin Oncol 20:1456-1466, 2002

5) 第 37 回癌治療学会,1999(抄録 MW 03-4)

6) Salmon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that Overexpresses HER2. N Engl J Med 344:783-792, 2001

7) American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual Chapter 25 Breast, p223-240, 6 th ed, Springer, 2002

カスタムアレイによる原発性乳癌の遺伝子発現解析

分担研究者 西尾和人 国立がんセンター研究所薬効試験部 室長

分担研究者 関島 勝 三菱化学安全科学研究所鹿島研究所応用生物研究細胞生物部 部長

研究要旨

乳がん術前化学療法による病理学的完全寛解を予測する因子を同定するために、患者の末梢血単核球、乳がん組織を採取し、検体管理、RNA 抽出、品質管理をおこない、新カスタムアレイによる遺伝子発現解析を実施した。新カスタムアレイには前年度基礎的検討から選択した乳がんのホルモン感受性関連遺伝子群を抗がん剤感受性規定因子に追加した。また、信頼性、再現性の向上を目的として統計解析に耐えうるよう、独自に設計され、そのアレイの質的な評価を経た後、臨床検体データの解析を開始した。遺伝子発現データの間接解析は、組織化されたこのプロジェクトが適正に運用されていることを支持している。次年度臨床試験が完結とともに、より精度の高い遺伝子発現解析データが得られ、病理学的完全寛解を予測する因子の選択が可能であると予測される。

A 研究目的

本年度の目的は、(1)新カスタムアレイの作製とその評価、(2)臨床サンプルの採取、検体管理、RNA 抽出、品質管理(3)新カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析の実施と定量的 PCR などによるその再現性の確認

B 研究方法

本年度は、

- (1)前年度基礎データを基に、ホルモン関連遺伝子を選択し、新カスタムアレイをデザイン、作製し、その評価をがん細胞株、ヒト臨床サンプルを用いて実施した。
- (2)臨床サンプルの採取、検体管理、RNA 抽出、バイオアナライザーを用いた品質管理をおこなった。
- (3)新カスタムアレイを用いた臨床検体の遺伝子発現解析を実施した。また得られた遺伝子発現解析データの評価を目的として、クラスタリングをおこなった。
- (4)得られた遺伝子マーカの生物学的な再現性の実証を定量的 PCR などでおこなう。
- (5)作製したアレイの精度を既存アレイと比較検討することで、その優位性を検証(大橋、竹内等)するための細胞株等の遺伝子発現解析を実施する。

C 研究結果

- (1) 前年度基礎データを基に、167種の乳癌細胞におけるホルモン療法に対する感受性に関連する遺伝子を選択し、以前より選択していた抗がん剤感受性関連遺伝子に加えて、新カスタムアレイにスポットした。アレイ内誤差を評価し、スポット位置による誤差を評価することにより、遺伝子発現の精度を向上するようにデザインした。実際に作製した新カスタムアレイを用い、がん細胞株、ヒト臨床サンプルの遺伝子発現解析を実施し、アレイの評価を統計学的に実施するため(大橋、竹内らが実施)の生データを提供した。
- (2) 臨床試験(国立がんセンター中央病院)で得られる臨床サンプルの採取、検体管理保存、RNA 抽出、バイオアナライザーを用いた品質管理をおこなった。集積中のサンプルは適正に管理、匿名化されて、順調に推移している。生検による乳癌組織、末梢血単核球については概ね良好な

質の RNA 回収を実現したが、手術切除標本から抽出した RNA の質については満足のものではなかった。またその原因について調査した。

(3)新カスタムアレイを用い末梢血単核球および乳がん組織から得られた遺伝子発現データの全遺伝子群を用い、クラスタリングを行った。遺伝子発現プロファイルは大きく、末梢血単核球と乳がん組織の 2 群に分けられ、発現プロファイルが異なることが示された(図1)。乳癌に過剰発現を示す遺伝子(Human estrogen-responsive gene 等)が得られた。

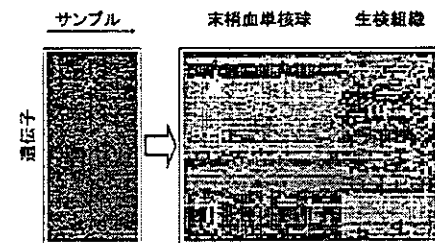


図1 新カスタムアレイを用いた臨床サンプルの遺伝子発現解析(全遺伝子)

(4)得られた遺伝子マーカの生物学的な再現性の実証を定量的 PCR を用いて検討するために、選択された遺伝子のプライマーを設計し、現在は新カスタムアレイに追加した乳がん・ホルモン関連167遺伝子のプライマーデザインが完成した。発現に差の認められた遺伝子の再現性の検討を開始した。

(5)新カスタムアレイに新たに追加した乳がん、ホルモン関連遺伝子群の発現プロファイルをクラスタリングし、全遺伝子でのクラスタリングを比較した。末梢血単核球の遺伝子発現解析は、全遺伝子とホルモン関連遺伝子群では、異なるパターンを示すのに対し、乳がん組織では両者で近似したパターンが認められた(図2)。

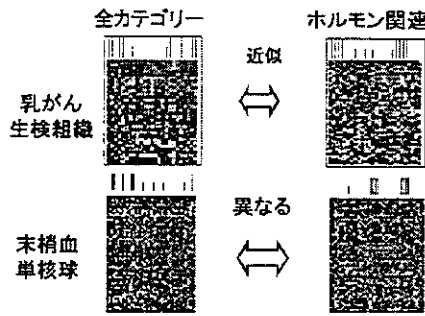


図2 新カスタムアレイを用いた臨床サンプルの遺伝子発現解析(ホルモン関連遺伝子)

D 考察

新カスタムアレイは本臨床試験実施の目的で適切にデザインされ、高い再現性と高精度の遺伝子発現データが得られている。臨床サンプルの採取、検体管理、RNA抽出、品質管理は概ね順調である。手術切除標本由来のRNAの質の劣化は、本研究実施の大きな障害とはならないと考えられるが、劣化を防ぐ最善の対策を講じる。

新カスタムアレイを用いた末梢血単核球および乳がん組織から得られた遺伝子発現解析データは、クラスタリングによるプロフィールから、良好なデータが集積されていることを示している。作成したアレイに付加された乳がん、ホルモン関連遺伝子群によりクラスタリングした乳がん組織の結果が全遺伝子群でクラスタリングした場合と近似したことは、乳がん組織がこれらの遺伝子により規定されている可能性を類推させる結果と考えられる。集積されるアレイデータと臨床効果との相関を統計学的に新たなアルゴリズムでの解析のために現在の品質の維持が重要と考えられる。

E 結論

乳がん術前化学療法による病理学的完全寛解を予測する因子を同定するため、新カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析が順調にすすんでいる。

F 健康危険情報 特になし

G 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi, F., Kusaba, H., Asai, A., Iwamoto, Y., Yano, K., Nakano, H., Mizukami, T., Saijo, N., Kato, H., Nishio, K. hnRNP L enhances sensitivity of the cells to KW-2189. *Int. J. Cancer*, 108:679-685, 2004.
2. Koizumi, F., Kanzawa, F., Ueda, Y., Koh, Y., Tsukiyama, S., Taguchi, F., Tamura, T., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ('Iressa') and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (Irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer*, 108:464-472, 2004.
3. Nishiyama, N., Okazaki, S., Cabral, H., Miyamoto,

- M., Kato, Y., Sugiyama, Y., Nishio, K., Matsumura, Y., Kataoka, K. Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in Mice. *Cancer Res.*, 63:8977-8983, 2003.
4. Suzuki, T., Agui, M., Togawa, T., Naganuma, A., Nishio, K., Tanabe, S. MRP5b/SMRP mRNA is highly expressed in metallothionein-deficient mouse liver. *J. Health Sci.*, 49:524-526, 2003.
5. Tsunoda, T., Koh, Y., Koizumi, F., Tsukiyama, S., Ueda, H., Taguchi, F., Saijo, N., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. *Int. J. Oncol.*, 23:49-59, 2003.
6. Usuda, J., Inomata, M., Fukumoto, H., Iwamoto, Y., Suzuki, T., Kuh, H.J., Fukuoka, K., Kato, H., Saijo, N., Nishio, K. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int. J. Oncol.*, 22:81-86, 2003.
7. Saijo, N., Nishio, K., Tamura, T. Translational and clinical studies of target-based cancer therapy. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:187-192, 2003.
8. Kanzawa, F., Akiyama, Y., Saijo, N., Nishio, K. In vitro effects of combinations of cis-amminedichloro (2-methylpyridine) platinum (II) (ZD0473) with other novel anticancer drugs on the growth of SBC-3, a human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, 40:325-332, 2003.
9. Nishiyama, N., Koizumi, F., Okazaki, S., Matsumura, Y., Nishio, K., Kataoka, K. Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin and cisplatin-incorporated polymeric micelles. *Bioconjug. Chem.*, 14:449-457, 2003.
10. Hiram, M., Takahashi, F., Takahashi, K., Akutagawa, S., Shimizu, K., Soma, S., Shimanuki, Y., Nishio, K., Fukuchi, Y. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett.*, 198:107-117, 2003.
11. Natsume, T., Watanabe, J., Koh, Y., Fujio, N., Ohe, Y., Horiuchi, T., Saijo, N., Nishio, K., Kobayashi, M. Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against VEGF-secreting human lung cancer *in vivo*. *Cancer Sci.*, 94:826-833, 2003.
12. Saijo, N., Tamura, T., Nishio, K. Strategy for the development of novel anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52:S97-S101, 2003.
13. Yamanaka, R., Akutagawa, S., Taguchi, F., Yajima, N., Tsuchiya, N., Uzuka, T., Morii, K., Takahashi, H., Tanaka, R., Saijo, N., Nishio, K. Selection of surrogate marker genes in primary central nervous system lymphomas for radio-chemotherapy by

DNA array analysis of gene expression profiles. Int. J. Oncol., 23:913-923, 2003.

2. 学会発表

1. Koizumi, F., Taguchi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839: A role for inhibiting phosphorylation of EGFR at Tyr1068. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
2. Jang, JH., Lee, SH., Kang JH., Nishio, K., Saijo, N., Kuh, HJ. ZD1839 potentiates the antiproliferative activity of paclitaxel and oxaliplatin against human gastric carcinoma cells in vitro. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
3. Sugiyama, K., Yamashita, K., Nishio, K., Akinaga, S., Kanazawa, J. Synergistic combined effect of vinorelbine and ZD1839 (Iressa) in NSCLC cell lines which overexpress the phosphorylated EGFR and ErbB2. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA
4. Shimoyama, T., Koizumi, F., Saijo, N., Nishio, K. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
5. Ohmori, T., Inoue, F., Yamaoka, T., Hirose, T., Horichi, N., Nishio, K., Adachi, M., Saijo, N., Arteaga, CL., Kuroki, T. EGFR-degradation activity contributed to ZD1839 (Iressa)-resistant mechanism in human non-small cell lung cancer cell lines. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet. 2003.7.11-15 Washington DC USA
6. Taguchi, F., Koh, Y., Koizumi, F., Shimoyama, T., Saijo, N., Nishio, K. Activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (VEGFR (KDR)-TKI), in a model of ZD1839 (Iressa) resistance. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA
- Tsunoda, T., Koh, Y., Nishio, K. Differential gene expression profiles and identification of the genes relevant to clinicopathologic factors in colorectal cancer selected by cDNA array method in combination with principal component analysis. Am. Assoc. Cancer Res. 94th Ann. Meet.. 2003.7.11-15 Washington DC USA
7. Hamano, T., Oide, A., Sekijima, M., Nishio, K., Takeuchi, M., Fujiwara, Y. Latin square design to gene expression experiments 11th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2003.6.30-7.3 Queensland, Australia

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

資料1 新カスタムフィルターアレイの作成

1 元としたフィルターアレイ (旧アレイ) の特徴

当プロジェクトの基礎的検討および新しいアレイ設計の元となったフィルターアレイのデザインを図1に示す。各色分けは細胞周期関連、シグナル関連遺伝子など各カテゴリーに分類されていた。長所としてはデータ変動を視覚的に各ブロック内で行ない易いことが挙げられるものの短所として得られたシグナル値の誤差が遺伝子プローブを配置した位置によるものか真の値かを識別出来ないことが挙げられた。更には、その値が位置による変動でないとした場合に、配置された遺伝子が1つであるために誤差の程度を評価する方法もないことが挙げられた。以上の短所は統計学上大いなる問題点であった。この問題点を解決し長所も残すために以下の順で改善を行ない、その設計のもと新たにホルモン関連遺伝子群を加えて新しいカスタムフィルターアレイは作成された。

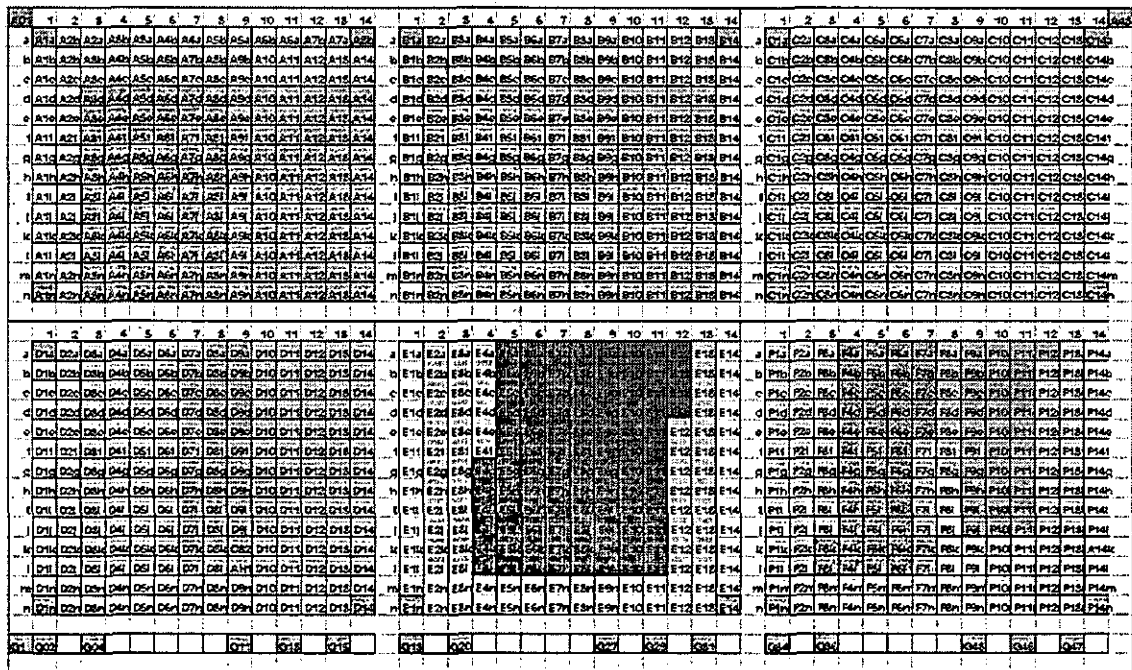


図1 旧アレイのスポット位置およびカテゴリー分類

2 無作為化することにより失われる旧アレイの長所の保持に関する検討

無作為化することにより失われる旧アレイの長所を保存するために遺伝子リストにカテゴリーフラッグを添付し(表1)得られるデータのフラッグを利用した抽出を可能とした。それにより旧アレイの有する長所を維持することが可能となった。

Category of Genes	Duplication, Triplication, or MultiSpot?
X: BLANK	D: Duplication
Y: GAPDH as Positive control	T: Triplication
	M: MultiSpot (GAPDH)
A: Cell cycle regulators	
B: Signal/Oncogene	Location category
C: RHO family related proteins	B: The boxes located in the Start or End Column of each blocks
D: related proteins >> re-categorized (so there is no D-category)	Y: The Boxes located between B-Boxes
E: Angiogenesis/Adhesion/Cell-cell interaction	
F: Growth factor	
G: Cytokine	
H: Apoptosis related proteins	
I: DNA transcription factors/Damage response, repair&recombination	
J: Metabolism/ Translation/ Protein Turnover	
K: Detoxification enzyme	
L: Transporters/ Nucleocytoplasmic Transporters/Symporters & antiporters	
M: Cytoskeletal proteins	
N: (N add)=New, (N)=Hormone related and receptors	

表 1 新カスタムアレイにおける新カテゴリー

3 複数スポットする遺伝子の選択に関する検討

旧アレイを用いシグナル検出の障害となりうる可能性が程の遺伝子が隣接しないようにする必要があった。そのために、細胞株も異なり、実験群も施行日も異なる完全に非依存的に行なわれた実験から無作為抽出で 5 種類のデータを抽出し、恒常的に変化が少ないと考えられ、なおかつ恒常的に高いシグナルもしくは低いシグナルを示す遺伝子プロブの検出を試みた。無作為抽出データ間のシグナル値に差異が存在した場合には、変化し得る遺伝子発現を捉えられるプロブと仮定し、各遺伝子の発現の順位をスコア化(図 2 内順序スコアの表記)した。最大変動は 718、最少変動は 4、変動の平均は 295、標準偏差は 146 であった。グラフの形状は全てのフィルターにおいて類似シグナルの補正によりデータの比較がフィルター間にて行えると考えられる。

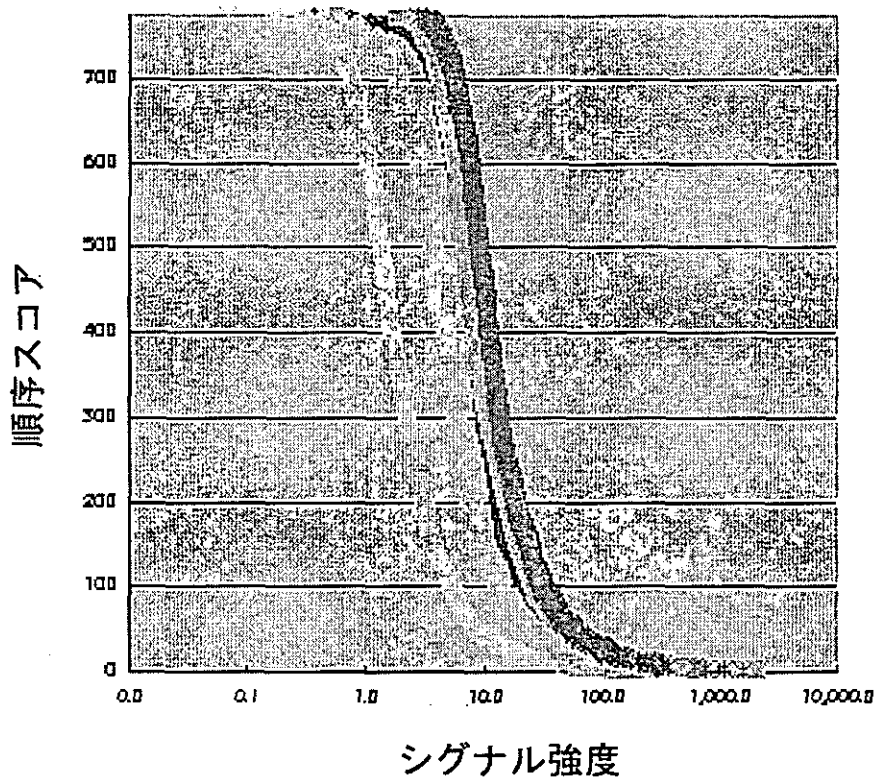


図2 各遺伝子の発現のシグナル強度と順位スコア

さらに、それらの平均を順位化し各変異をグループ化し変動スコア (図 3)とした。た変化を大きく捉えられる可能性のある遺伝子プローブ群を検討した。スコアの平均は 295(38%)であり、その標準偏差は 146(19%)であったことから、その変動の表現形を変動スコアを標準偏差となる%およびその倍数と1%、5%未満の6段階 0-5(0:<1%; 1:<5%; 2:<19%; 3:<38%; 4:<57%; 5:>57%)と定義した。変動スコアは、実験間で 19-57%の順位変動を起す可能性が高いことを示しており、それらは細胞株による生物学的変化の差も実験手技によるばらつきによる変動も含まれると考えられる。シグナル強度が恒常的に「高い、中程度、低い」を示す可能性が高い群の中から選択する際にシグナルが非常に高い群には飽和したシグナルが含まれている可能性が存在すること、およびシグナル強度が飽和していないと考えられるにも関わらず順位スコアが常に高い場合はプローブへのハイブリが飽和している可能性も考慮し、実際のシグナル強度が非常に高い場合と順位スコアが常に高い場合は重複遺伝子の選択から省くこととした。図内表記のごとく変動スコアと群分けされたものを更に順位スコアで亜群に分け、それら各群の中から無作為になおかつ均等に複数化遺伝子を選択した。変動スコア2で順位スコア<120、120-600、>600をそれぞれのA、B、Cの3群に、以下同様に変動スコア3、順位スコア<220、220-550、>550をD、E、F群、スコア4、順位スコア<320、320-450、>450をG、H、I群、変動スコア5、順位スコア220-550をJ群、それ以外(スコア0、1またはJ以外のスコア5)をXと亜群化した。A-JおよびX群の内X群は恒常的に変動も小さくシ

グナルも非常に弱い可能性が高い群の可能性がありノイズとしての意味が強いと予測されることから A-J の 10 群より各群均等に複数化する遺伝子が無作為的に抽出した。

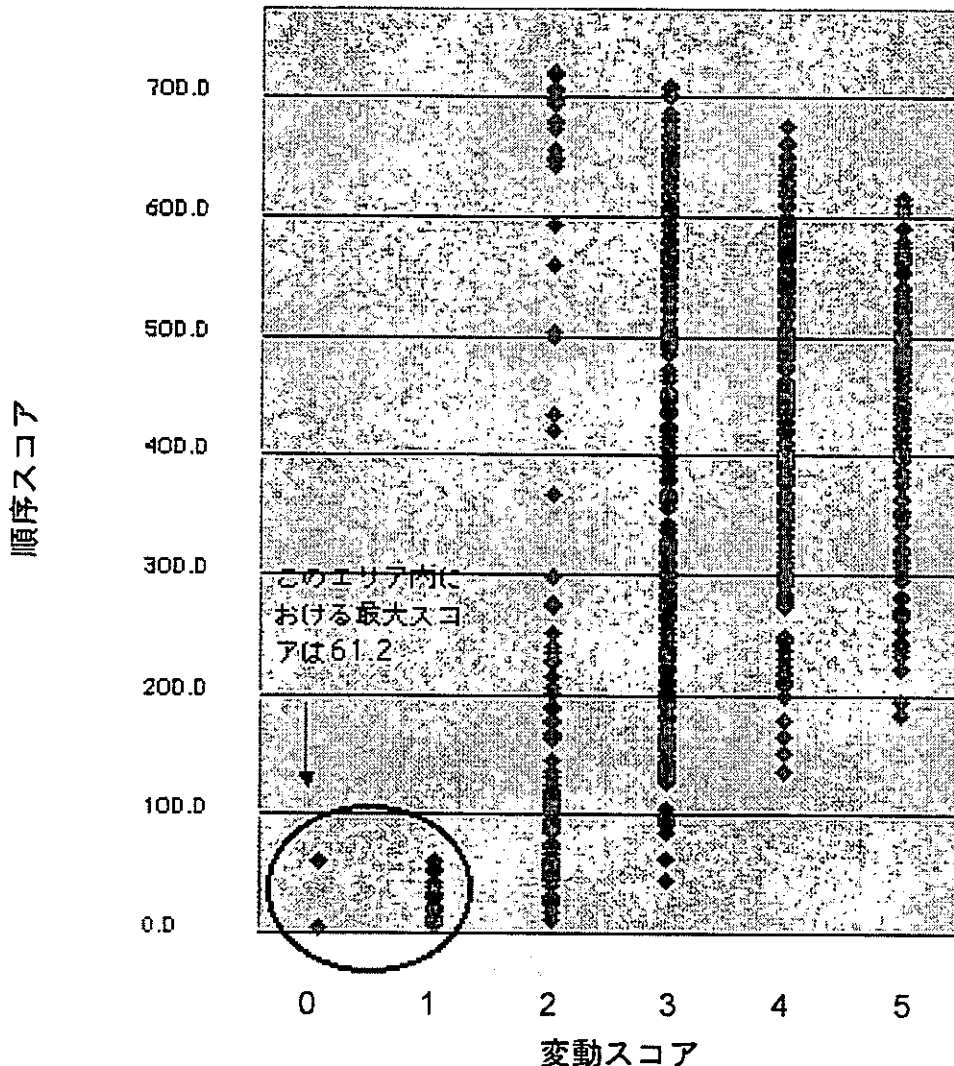


図3 遺伝子発現変動のスコアと順位スコアの関係

4 位置的問題の解消および遺伝子の複数配列に関する検討

前段落 (B) により選択した遺伝子の周囲に低いシグナルの遺伝子が配列された場合においても、それらシグナルの検出の妨げを最小限にとどめるために、恒常的に高いシグナル値を示すものおよび、妨げられた場合でも複数化されたことで最低一つの配置された遺伝子のシグナルは測定可能となるように、図に示すごとく黄色い (恒常的に高いシグナルとなる可能性が高いものを配置する) 部分と、青い (黄色に配置された遺伝子が強いシグナルを発した場合でも、最低一つの遺伝子のシグナルを得るために複数の遺伝子を配置する) 部分と、白い (その他のシグナルの動きを捕らえ易いと考えられる遺伝子やシグナルの強度が未知である新しく選択した遺伝群を配置する) 部分に分け (図 4)、各色内においては、

遺伝子の位置的誤差を統計学的に判定する為にピックアップされた遺伝子に乱数を与え無作為的に配置する事とした。

図4 新カスタムアレイにおける複数スポットの位置

5 最終的遺伝子リスト

ホルモン関連遺伝子を加えた遺伝子リストは図1~4、表1により決められた配置にスポットされた。遺伝子 Accession 番号および遺伝子名以外にフィルター上位置情報、カテゴリーフラッグが含まれた遺伝子リストを表2に示す。作成された cDNA フィルターアレイを用い臨床検体のデータが集積されている。

表2 遺伝子リスト

line number for V46	Address V46	Gene category	Gene	GenBankA cc#
1	A01a	G	interleukin 9 precursor (IL9); T-cell growth factor p40	X17543; M30134
2	A01b	Y	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677
3	A01c	N	interleukin 3 receptor beta subunit precursor (IL3R-beta; IL3RB); interleukin 5 receptor beta subunit precursor (IL5R-beta; IL5R); cytokine receptor common beta chain precursor; CSF2RB	M59941
4	A01d	J	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-1 precursor (UDPGT; UGT1.1; UGT1A; GNT1); bilirubin-specific isozyme 1 (hUG-BR1)	M57899
5	A01e	I	IkappaB epsilon (IKBE)	U91616
6	A01f	K	90-kDa heat-shock protein A (HSP90A); HSP86; HSPCA	X07270
7	A01g	C	RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDIG	U82532
8	A01h	Y	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677
9	A01i	I	X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	M36089
10	A01j	N	TRAIL receptor 3; decoy receptor 1 (DCR1)	AF016267
11	A01k	J	adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486
12	A01l	E	wingless-related MMTV integration site 8b protein (WNT8B)	X91940
13	A01m	B	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-likeprotein TC25	M29870; M31467
14	A01n	Y	liver glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; G3PDH)	X01677
15	A02a	B	ras-related protein RAB5C	U18420
16	A02b	K	glutathione-S-transferase homolog	U90313
17	A02c	X		

18	A02d	B	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-likeprotein TC25	M29870; M31467
19	A02e	K	glutathione-S-transferase homolog	U90313
20	A02f	L	MRP/organic anion transporter (MOAT-B)	AF071202
21	A02g	G	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	X14454
22	A02h	I	xeroderma pigmentosum group B complementing protein (XPB); excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 3 (ERCC3); basal transcription factor 2 89-kDa subunit (BTF2p89; TFIIH 89-kDa subunit)	M31899
23	A02i	I	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)	L04791
24	A02j	N	ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2	M95667; M11730
25	A02k	I	histone deacetylase 2 (HD2)	U31814
26	A02l	B	protein kinase C delta (PKC-delta)	D10495
27	A02m	E	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616
28	A02n	K	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236
29	A03a	F	src homology 2 protein (SHB)	X75342
30	A03b	B	microtubule-associated protein 2 (MAP2)	U01828
31	A03c	N	ACO2; human aconitate hydratase; aconitase 2	U87939
		ad		
		d		
32	A03d	B	protein kinase C gamma type (PKC-gamma)	Z15114
33	A03e	I	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBE2D3); UBCH5C	U39318
34	A03f	N	CD14	NM_00059
		ad		1
		d		
35	A03g	N	TP53BP2	NM_00542
		ad		6
		d		
36	A03h	N	BDP1, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18	X79568
		ad		

		d		
37	A03i	J	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-2 precursor (UDPGT; UGT1.2; UGT1B; GNT1); HLUGP4	S55985
38	A03j	J	cytochrome P450 IIIA3 (CYP3A3); CYP3A4; niphedipine oxidase	M18907
39	A03k	A	CDC42 GTPase-activating protein	U02570
40	A03l	J	ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit; ribonucleotide reductase	X59618
41	A03m	N	mRNA for GCM motif protein, complete cds	AB026493
		ad		
		d		
42	A03n	B	serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	U48736
43	A04a	B	lung phospholipase A2 group IB (PLA2G1B); phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	M21054
44	A04b	B	Wilms' tumor protein (WT33; WT1)	X51630
45	A04c	B	cyr61 protein precursor; GIG1 protein; insulin-like growth factor-binding protein 10 (IGFBP10)	Y12084
46	A04d	I	relA proto-oncogene; nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (NFKB3)	L19067
47	A04e	H	BCL2 & p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2)	U58334
48	A04f	G	interferon gamma-induced protein precursor (gamma-IP10)	X02530
49	A04g	N	AHR; AhR; arly hydrocarbon receptor	NM_00162
		ad		1
		d		
50	A04h	H	BCL2-binding athanogene 1 (BAG1); glucocorticoid receptor-associated protein RAP46	S83171; Z35491
51	A04i	B	casein kinase I gamma 3 subunit (CSNK1G3)	AF049089
52	A04j	J	cytochrome P450 IA1 (CYP1A1); P450-P1; P450 form 6; P450-C	K03191
53	A04k	I	DNA topoisomerase I (TOP1)	J03250
54	A04l	N	insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1); placental protein 12 (PP12)	M31145
55	A04m	G	HLA class II histocompatibility antigen alpha chain precursor	K01171
56	A04n	B	protein phosphatase 2A B56-beta (PP2A)	L42374
57	A05a	J	farnesyl pyrophosphate synthetase (FPS); farnesyl diphosphate synthase (FDPS);	J05262

			dimethylallyltransferase; geranyltransferase; KIAA0032	
58	A05b	N	platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFR-beta; PDGFRB); CD140B antigen	M21616
59	A05c	G	interleukin 3 precursor (IL3); multipotential colony-stimulating factor; hematopoietic growth factor; P-cell stimulating factor; mast-cell growth factor (MCGF)	M14743; M17115
60	A05d	I	ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6A	M74524
61	A05e	I	high mobility group protein HMG2	X62534
62	A05f	B	phospholipase C delta-1 (PLC-delta 1; PLCD1); PLC-III; 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta 1	U09117
63	A05g	B	cbl-associated protein SH3P12	AF136381
64	A05h	N ad d	aromatase system cytochrome P-450 (P450XIX) mRNA, complete cds,aromatase mRNA, complete cds,aromatase (Aro1) mRNA, complete cds,mRNA for aromatase (estrogen synthetase),cytochrome P-450 aromatase mRNA, complete cds,mRNA for aromatase P-450	J04127
65	A05i	B	ras homolog gene family member A (RHOA; ARHA); ARH12; H12	L25080
66	A05j	N ad d	UBE2B	NM_00333 7
67	A05k	B	protein phosphatase PP2A 65-kDa regulatory subunit beta (P65-beta)	M65254
68	A05l	B	glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3-beta); tau kinase subunit; factor A	L33801
69	A05m	E	matrix metalloproteinase 12 (MMP12)	L23808
70	A05n	N ad d	XRCC5	J04977
71	A06a	B	c-myc-binding protein MM-1; prefoldin 5 (PFDN5; PFD5)	D89667
72	A06b	A	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor 2D (CDKN2D); p19-INK4D	U40343; U20498
73	A06c	N	PDZ domain containing-protein (PDZK1) from kidney cDNA	AF012281

		ad	library; membrane-associated protein	
		d		
74	A06d	I	Ku (p70/p80) subunit; ATP-dependent DNA helicase II 86-kDa subunit; lupus ku autoantigen protein; thyroid-lupus autoantigen (TLAA); CTC box binding factor 85-kDa subunit (CTCBF; CTC85); nuclear factor IV	M30938
75	A06e	B	phospholipase C beta 3 (PLC-beta 3; PLCB3); 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta 3	Z16411
76	A06f	N	ESR2; ER beta; Estrogen receptor β	NM_00143
		ad		7
		d		
77	A06g	A	G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1)	M25753
78	A06h	H	caspase 9 precursor (CASP9); MCH6; ICE-like apoptotic protease 6 (ICE-LAP6); apoptotic protease activating factor 3 (APAF3)	U56390; U60521
79	A06i	E	laminin beta 1 subunit precursor (laminin B1; LAMB1)	M61916
80	A06j	N	complement factor B; class III MHC; B-factor, properdin	X72875
		ad		
		d		
81	A06k	G	interferon alpha-induced 11.5-kDa protein	X67325
82	A06l	N	KRT8	M26324
		ad		
		d		
83	A06m	F	keratinocyte growth factor (KGF); fibroblast growth factor 7 (FGF7)	M60828
84	A06n	N	STAT-induced STAT inhibitor-2, SOCS-2 with insulin-like growth factor-I receptor	AF037989
		ad		
		d		
85	A07a	B	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit delta isoform (PI3-kinase p110 subunit delta; PTDINS-3-kinase p110; PI3K)	U86453
86	A07b	L	ATP-binding cassette subfamily B (MDR/TAP) member 1 (ABCB1); multiple drug resistance 1 protein (MDR1); P glycoprotein 1 (PGY1)	M14758
87	A07c	K	glutathione reductase (GRase; GSR; GR)	X15722

88	A07d	G	interleukin 17 precursor (IL17); cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8 (CTLA8)	U32659
89	A07e	N	interferon gamma receptor (IFNGR)	A09781
90	A07f	N	IGF1R(insulin-like growth factor receptor)	NM_00087
		ad		5
		d		
91	A07g	B	90-kDa diacylglycerol kinase beta (DGKB; DAGK2); KIAA0718	AB018261
92	A07h	E	beta 3-endonexin	U37139
93	A07i	A	cell cycle progression restoration protein 8 (CPR8)	AF011794
94	A07j	E	laminin beta 2 subunit precursor (laminin B2; LAMB2); S-laminin	S77512
95	A07k	N	SPS	NM_01224
		ad		7
		d		
96	A07l	E	cadherin 11 precursor (CDH11); osteoblast-cadherin (OB-cadherin); OSF4	L34056
97	A07m	B	protein kinase DYRK3	Y12735
98	A07n	B	protein phosphatase 2C gamma	Y13936
99	A08a	J	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604
100	A08b	N	phosphoinositide-3-kinase, class 3	Z46973
		ad		
		d		
101	A08c	N	fructose 1,6-bisphosphatase; fructose-bisphosphatase 1	M19922
		ad		
		d		
102	A08d	B	SH3-binding protein 2	AF000936
103	A08e	E	matrix metalloproteinase 16 precursor (MMP16); membrane-type matrix metalloproteinase 3 (MT-MMP3); MMP-X2	D50477
104	A08f	N	PPP1CB	X80910
		ad		
		d		
105	A08g	C	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDI	X69550

106	A08h	I	recA-like protein HsRad51; DNA repair protein RAD51 homolog	D13804
107	A08i	N	SRC-1, steroid receptor coactivator (SRC-1)	U40396
		ad		
		d		
108	A08j	N	cytochrome P450-2A6 (CYP2A6) mRNA, complete cds	AF182275
		ad		
		d		
109	A08k	B	myeloid cell leukemia protein 1 (MCL1)	L08246
110	A08l	L	mediator protein; SUR2	AF135022
111	A08m	N	ITGAV	NM_00221
		ad		0
		d		
112	A08n	N	ENO2 for neuron specific (gamma) enolase; enolase 2	X51956
		ad		
		d		
113	A09a	B	EB1 protein	U24166
114	A09b	A	CDC-like kinase 3 (CLK3)	L29220
115	A09c	I	DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA metase; MCMT)	X63692
116	A09d	H	cytochrome c	M22877
117	A09e	E	acidic fibroblast growth factor (AFGF) + heparin-binding growth factor 1 precursor (HBGF-1) + beta-endothelial cell growth factor (ECGF-beta)	X65778 + X51943 + M13361
118	A09f	B	colorectal mutant cancer protein (MCC)	M62397
119	A09g	I	RNA helicase	X98743
120	A09h	H	inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP2; IAP2); IAP homolog B; TNFR2-TRAF signaling complex protein 2; MIHC	U45879; U37547
121	A09i	A	wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee-1-like protein kinase	U10564
122	A09j	N	tetraspan NET-1	AF065388
		ad		
		d		
123	A09k	N	insulin-like growth factor IA precursor (IGF1A); IGFBP1; somatomedin C + insulin-like growth factor I (IGF1)	M27544 + M37484
124	A09l	I	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK); dC-stretch-binding protein (CSBP); transformation-upregulated nuclear protein	S74678

125	A09m	I	RAD51C truncated protein	AF029670
126	A09n	B	c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1); JNK46	L26318
127	A10a	H	BCL2-associated X protein membrane (BAX)	L22474
128	A10b	B	stathmin; phosphoprotein p19 (PP19); oncoprotein 18 (OP18); leukemia-associated phosphoprotein p18 (LAP18); prosolin; metablastin	J04991
129	A10c	I	cytosolic thymidine kinase (TK1)	K02581
130	A10d	N	HADHB	NM_00018
		ad		3
		d		
131	A10e	B	cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit (PRKAR1B)	M65066
132	A10f	N	rcn, calcium binding protein, ER-hand protein, ER-resident protein, reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	D42073
		ad		
		d		
133	A10g	E	cadherin 5 (CDH5); vascular endothelial cadherin precursor (VE-cadherin); 7B4 antigen; CD144 antigen	X79981; X59796
134	A10h	A	RBP2 retinoblastoma binding protein	S66431
135	A10i	E	lamin C	M13451
136	A10j	G	interleukin 1 receptor antagonist protein precursor (IL1RA; IRAP)	M63099
137	A10k	I	CAD; DNA fragmentation factor 40-kDa subunit (DFF40)	AF064019
138	A10l	I	DNA fragmentation factor 45 (DFF45)	U91985
139	A10m	N	insulin receptor substrate 1	S62539
140	A10n	B	mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP kinase kinase 4; MKK4; PRKMK4); c-jun N-terminal kinase kinase 1 (JNKK1); JNK-activating kinase 1; SAPK/ERK kinase 1 (SERK1; SEK1)	L36870
141	A11a	G	interleukin 7 (IL7)	J04156
142	A11b	K	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236
143	A11c	N	GALGT2	AJ517771, AJ517770
		ad		
		d		
144	A11d	I	natural killer cell enhancing factor (NKEFB); thiol-specific antioxidant protein (TSA); thioredoxin peroxidase 1	L19185; Z22548;

			(TDPX1); thioredoxin-dependent peroxide reductase 1	X82321
145	A11e	H	BCL2-interacting killer protein (BIK); NBK apoptotic inducer protein; BP4; BIP1	X89986; U34584
146	A11f	N	transforming growth factor beta receptor III precursor (TGF beta receptor III; TGFR3); betaglycan	L07594
147	A11g	J	cytochrome P450 IIC8 (CYP2C8); mephenytoin 4-hydroxylase	Y00498
148	A11h	B	Homo sapiens forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma) (FOXO1A), mRNA	NM_00201 5
149	A11i	N	vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor (VEGFR2); kinase insert domain receptor (KDR); FLK1	L04947; X61656
150	A11j	B	ras-related protein RAB4A	M28211
151	A11k	N	interleukin 6 receptor beta subunit precursor (IL6R-beta; interleukin 6 signal transducer (IL6ST); membrane glycoprotein 130 (GP130); oncostatin M receptor; CDW130 antigen	M57230
152	A11l	J	farnesyltransferase alpha	L10413
153	A11m	B	cAMP-dependent protein kinase I alpha regulatory subunit (PRKAR1); tissue-specific extinguisher 1 (TSE1)	M33336
154	A11n	I	adenovirus E1A enhancer-binding protein; E1A-F; ets translocation variant 4	U18018
155	A12a	B	ras-like protein TC10	M31470
156	A12b	E	integrin beta 1 (ITGB1)	M34189
157	A12c	F	hepatocyte growth factor-like protein (HGF activator-like protein); hyaluronan-binding protein (PHBP)	D49742; S83182
158	A12d	A	MDM2-like p53-binding protein (MDMX)	AF007111
159	A12e	I	CTP synthase; CTP synthetase; UTP-ammonia ligase	X52142
160	A12f	I	phosphatidic acid phosphatase 2B	AF017786
161	A12g	I	histone 4 (H4)	X67081
162	A12h	G	interleukin 11 (IL11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	M57765
163	A12i	K	glutathione S-transferase pi (GSTP1); GST3	X08058; M24485
164	A12j	E	Human paxillin mRNA, complete cds	U14588
165	A12k	N	interleukin 2 receptor alpha subunit precursor (IL2 receptor alpha subunit; IL2RA); TAC antigen; CD25 antigen	X01057; X01058;