

の影響が大きいことが予想されたため、T7-RNA 増幅法を実施した場合と実施していない場合の、それぞれについてサブグループ解析を行った。6日間の ICC の変化を調べるため、1日の3枚のアレイ毎にも解析を行なった。信頼性の検討は、級内相関係数(以下、ICC と表す)を用いて行なった。

この実データに対する解析結果に基づき、日間ばらつきを考慮して、cDNA マクロアレイ実験のデザ

インを3つ想定した。設定1は、同日内で、同じ処理を施行した検体を2枚のアレイを用いて測定する場合。設定2は、同日内で、処理1を施行した検体と処理2を施行した検体をそれぞれ1枚ずつのアレイを用いて測定する場合。設定3は、同日内で、処理1を施行した検体と処理2を施行した検体をそれぞれ2枚ずつのアレイを用いて合計4枚のアレイにて測定する場合である。アレイの枚数は3つのデザイン間で同じである。それぞれのデザインに関して、モデルと分散分析表を作成した。興味があるのは、異なる処理の影響により、有意な遺伝子発現量の変化をしている遺伝子が存在するかどうかである。これに関してF検定を行なう場合に、必要なアレイの繰り返し数について、検出力の観点から検討した。

C. 研究結果

実データに対する解析によって、各ばらつき要因の分散推定値は、遺伝子が 0.538、日が 0.763、アレイが 0.254、誤差が 0.393 となり、ICC は 0.273 と低かった。測定日間のばらつきが大きいことが確認された。また、T7-RNA 増幅法を実施した3枚のアレイと T7-RNA 増幅法を実施していない3枚のアレイに対するサブグループ解析の結果、前者では、各ばらつき要因の

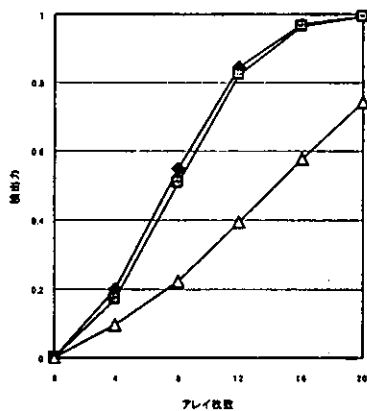
分散推定値は、遺伝子が 0.513、日が 1.281、アレイが 0.129、誤差が 0.154 となり、ICC が 0.247 と低かったのに対し、後者では、遺伝子が 0.951、日が 0.246、アレイが 0.380、誤差が 0.244 となり、日間ばらつきが小さくなったことで、ICC は 0.522 と上昇した。

検出力とアレイ枚数の検討によって、3つのデザインの比較を行なった結果を下図に示す。ただし、対立仮説を、発現量が2倍になる遺伝子が全体の中で1%あるとした場合である。[設定1]、[設定2]、[設定3]の順に検出力は上昇した。つまり、同日内では、異なる処理を施行した2枚のアレイを比較した方がよく、且つ、それぞれの処理を施行したアレイの繰り返しを行なった方がよいことが示された。

D. 考察

本研究で解析した cDNA マクロアレイ実験では、ばらつきは大きく、信頼性は低かった。日間ばらつきが大きかった原因としては、日間の実験条件の違いのほか、実験を行なった研究者の技術的な向上による影響も大きかったと考えられる。よって、実験を行なう技術者は、実際に実験を始める前に、ある程度高い ICC の値が出るまで練習を行なう必要があると考えられる。その他、十分な信頼性を得られなかった原因として、同じアレイ上での同一遺伝子の繰り返しがなされていなかったことなどが挙げられる。アレイ上における同一遺伝子の繰り返しにより、アレイと遺伝子の交互作用によるばらつきの大きさの定量化にもつながる。このように、cDNA マクロアレイ実験では、様々なばらつき要因が存在するため、状況に応じて、ばらつきの大きい要因を考慮した実験デザインの下、実験を行なう必要があることが示唆された。また、実験を行なう前に、予備的検討をして、ある程

度の必要な繰り返し数の目安をつけておくことの重要性が示された。それを考慮せずに実験を行なうと、十分な検出力を得られなかったり、必要以上に繰り返すことで無駄にコストがかかってしまう可能性がある。今回、日間ばらつきに着目し、アレイの繰り返しの検討を行なったが、アレイ以外にも、繰り返しを行なう実験段階は存在するので、今後検討の課題としたい。また、今回信頼性の指標に ICC を用いたが、その他の指標についても今後検討する必要がある。



- ◆：同日内で、処理 1 を施行した検体と処理 2 を施行した検体をそれぞれ 2 枚ずつのアレイを用いて合計 4 枚のアレイにて測定する場合 [設定 3]
- ：同日内で、処理 1 を施行した検体と処理 2 を施行した検体をそれぞれ 1 枚ずつのアレイを用いて測定する場合 [設定 2]
- ▲：同日内で、同じ処理を施行した検体を 2 枚のアレイを用いて測定する場合 [設定 1]

発現量が 2 倍になる遺伝子が、全体の遺伝子の中に 1%ある場合での、3つの実験デザインの比較

E. 結論

新カスタムアレイにおいて、遺伝子発現量を測定する際に生じるばらつき要因の特定と、その要因の分散の推定を行なった。その結果に基づき、ばらつきの大きい要因を考慮した実験デザインを想定し、そのデザインの下で十分な検出

力を確保するために必要な繰り返し数の見積もりを行なった。同結果を基に、臨床サンプルの解析を行うことで、信頼性の向上した遺伝子発現解析の実施が可能である。

F. 健康危害情報

特になし

G. 研究発表

- Tominaga, R., Koyama, H.,
1. Toge, T., Miura, S., Sugimachi, K., Ymaguchi, S., Hirata, K., Ohashi, Y., Abe, O. Randomized controlled trial comparing oral doxifluridine plus oral cyclophosphamide with doxifluridine alone in women with node-positive breast cancer after primary surgery. *J. Clin. Oncol.* 21: 991-998, 2003.
 2. Yanaka, N., Kinoshita, T., Asada, T., Ohashi, Y.: Long-linear models for assessing gene-ageinteraction and their application to case-control studies of the apolipoprotein E (apoE) gene in Alzheimer's disease. *J. Human Genet.* 48:520-524, 2003.
 3. Kawado, M., Hinotsu, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, T., Hashimoto, S., Ohashi, Y. A comparison of error detection rates between the reading aloud method and the double date entry method. *Controlled Clinical Trials* 24: 560- 569, 2003.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

資料4 フィルターアレイにおいて繰り返し測定された遺伝子の詳細

(address:アレイ内のスポット位置, Gene:遺伝子名, GenBank:GenBank Database における遺伝子 ID, obs1:obs3:3枚のアレイにおける遺伝子強度(生データ), Type:遺伝子の機能別分類番号)

1. 新フィルターアレイ

NO	address	Gene	GenBank	obs1	obs2	obs3
20	A02f	MRP/organic anion transporter (MOAT-B)	AF071202	75.87	82.46	69.65
953	E13a	MRP/organic anion transporter (MOAT-B)	AF071202	65.45	71.84	66.67
1052	F06b	MRP/organic anion transporter (MOAT-B)	AF071202	61.52	64.17	55.66
1115	F10i	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 2 (DNMT2)	AJ223333	60.18	68.01	56.02
1150	F13b	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 2 (DNMT2)	AJ223333	56.32	61.04	55.73
1151	F13c	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 2 (DNMT2)	AJ223333	57.53	62.85	56.84
26	A02l	protein kinase C delta (PKC-delta)	D10495	77.1	93.89	81.72
564	C13d	protein kinase C delta (PKC-delta)	D10495	67.8	85.08	66.81
1011	F03c	protein kinase C delta (PKC-delta)	D10495	74.1	83.1	69.33
459	C05k	interleukin 2 receptor gamma subunit (IL2R-gamma; IL2RG); cytokine receptor common gamma chain precursor	D11086	62.38	65.2	58.95
757	D13a	interleukin 2 receptor gamma subunit (IL2R-gamma; IL2RG); cytokine receptor common gamma chain precursor	D11086	73.73	74.92	68.93
780	D14j	interleukin 2 receptor gamma subunit (IL2R-gamma; IL2RG); cytokine receptor common gamma chain precursor	D11086	157.49	206.45	227.61
220	B02j	phospholipase C (PLCL)	D42108	127.29	195.93	221.91
511	C09g	phospholipase C (PLCL)	D42108	67.69	67.3	64.36
966	E13n	phospholipase C (PLCL)	D42108	65.12	71.45	60.83
197	B01a	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor (UDPGT; UGT1.6; UGT1F; GNT1)	J04093	64.15	68.74	57.92
392	B14n	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor (UDPGT; UGT1.6; UGT1F; GNT1)	J04093	61.15	66.21	56.32
568	C13h	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor (UDPGT; UGT1.6; UGT1F; GNT1)	J04093	94.39	165.1	115.1
141	A11a	interleukin 7 (IL7)	J04156	72.89	73.47	64.43
770	D13n	interleukin 7 (IL7)	J04156	85.68	99.31	68.92
1155	F13g	interleukin 7 (IL7)	J04156	85.4	105.93	94.92
689	D08c	matrix metalloproteinase 9 (MMP9); gelatinase B; 92-kDa type IV collagenase	J05070; D10051	72.39	77.94	62.45

	precursor (CLG4B)				
1160 F13l	matrix metalloproteinase 9 (MMP9); gelatinase B; 92-kDa type IV collagenase	J05070; D10051	61.48	70.99	58.55
	precursor (CLG4B)				
1167 F14e	matrix metalloproteinase 9 (MMP9); gelatinase B; 92-kDa type IV collagenase	J05070; D10051	136.09	165.36	154.97
	precursor (CLG4B)				
567 C13g	c-fos proto-oncogene; G0S7 protein	K00650	71.09	100.28	77.84
668 D06j	c-fos proto-oncogene; G0S7 protein	K00650	103.46	115.8	92.81
1162 F13n	c-fos proto-oncogene; G0S7 protein	K00650	64.34	75.64	64.46
557 C12k	peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR-alpha; PPARA)	L02932	60.48	63.12	57.66
573 C13m	peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR-alpha; PPARA)	L02932	75.68	104.74	89.99
957 E13e	peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR-alpha; PPARA)	L02932	142.16	161.41	93.97
23 A02i	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)	L04791	85.37	84.88	80.91
207 B01k	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)	L04791	119.75	174.54	218.83
1055 F06e	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)	L04791	63.2	65.67	61.78
221 B02k	heat shock 70-kDa protein 4 (HSPA4); HSP70RY; heat shock 70-related protein APG-2	L12723	132	190.84	234.48
994 F01n	heat shock 70-kDa protein 4 (HSPA4); HSP70RY; heat shock 70-related protein APG-2	L12723	143.55	157.78	132.27
1157 F13i	heat shock 70-kDa protein 4 (HSPA4); HSP70RY; heat shock 70-related protein APG-2	L12723	112.29	175.53	142.55
27 A02m	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616	98.92	155.97	183.48
361 B12k	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616	141.42	153.08	141.78
1165 F14c	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)	L13616	71.31	118.2	117.8
581 C14g	retinoblastoma-related protein p107	L14812	123.42	194.77	113.03
632 D04b	retinoblastoma-related protein p107	L14812	72.02	76.69	60.34
976 E14j	retinoblastoma-related protein p107	L14812	174.23	216.38	265.74
469 C06g	cadherin 8 (CDH8)	L34060	60.58	61.79	58.98
955 E13c	cadherin 8 (CDH8)	L34060	65.54	67.99	57.89
1152 F13d	cadherin 8 (CDH8)	L34060	59.3	64.75	55.2
759 D13c	sulfonylurea receptor (SUR); ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 8 (ABCC8)	L78207	127.14	110.52	166.1
784 D14n	sulfonylurea receptor (SUR); ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP)	L78207	132.51	188.23	197.85

	member 8 (ABCC8)					
888	E08f	sulfonylurea receptor (SUR); ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP)	L78207	64.33	68.62	58.56
		member 8 (ABCC8)				
574	C13n	urokinase-type plasminogen activator precursor (U-plasminogen activator; UPA)	M15476; D00244	180.82	270.99	293.62
816	E03d	urokinase-type plasminogen activator precursor (U-plasminogen activator; UPA)	M15476; D00244	314.24	336.07	291.98
1154	F13f	urokinase-type plasminogen activator precursor (U-plasminogen activator; UPA)	M15476; D00244	251.31	375.31	368.19
444	C04j	cytochrome P450 IID6 (CYP2D6)	M20403; M19697	80.82	78.1	81.6
563	C13c	cytochrome P450 IID6 (CYP2D6)	M20403; M19697	76.96	79.29	79.3
758	D13b	cytochrome P450 IID6 (CYP2D6)	M20403; M19697	97.49	96.2	111.2
510	C09f	erbB3 proto-oncogene; HER3	M29366; M34309	75.4	88.42	84.65
777	D14g	erbB3 proto-oncogene; HER3	M29366; M34309	90.43	95.48	83.76
983	F01c	erbB3 proto-oncogene; HER3	M29366; M34309	70.13	76.56	67.94
13	A01m	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-like protein TC25	M29870; M31467	111.13	222.61	293.21
18	A02d	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-like protein TC25	M29870; M31467	106.65	81.38	112.34
675	D07c	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-like protein TC25	M29870; M31467	121.2	132.83	138.24
22	A02h	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	135.83	150.61	185.9
281	B07a	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	104.33	96.49	92.15
583	C14i	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	140.78	321.45	178.46
199	B01c	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2)	M35410	141.3	176.33	162.17
772	D14b	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2)	M35410	154.32	151.87	168.2
788	E01d	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2)	M35410	71.89	79.45	65.53
9	A01i	X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	M36089	139.63	134.87	177.46

235 B03k	X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	M36089	83.68	86.18	82.14
561 C13a	X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	M36089	61.57	78.62	70.25
162 A12h	interleukin 11 (IL11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	M57765	81.65	85.65	74.8
203 B01g	interleukin 11 (IL11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	M57765	68	71.24	61.42
217 B02g	interleukin 11 (IL11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	M57765	70.21	70.02	61.52
3 A01c	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	114.43	104.14	145.52
896 E08n	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	67.61	71.7	62
1153 F13e	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	76.49	81.61	80.39
118 A09f	colorectal mutant cancer protein (MCC)	M62397	72.84	72.57	59.27
211 B02a	colorectal mutant cancer protein (MCC)	M62397	63.55	65.92	59.59
216 B02f	colorectal mutant cancer protein (MCC)	M62397	82	86.71	86.12
222 B02l	integrin beta 7 precursor (ITGB7)	M62880; S80335	65.23	73.37	65.79
895 E08m	integrin beta 7 precursor (ITGB7)	M62880; S80335	67.57	72.59	61.91
956 E13d	integrin beta 7 precursor (ITGB7)	M62880; S80335	78.34	91.24	64.55
24 A02j	ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2	M95667; M11730	71.09	73.47	59
174 A13f	ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2	M95667; M11730	67.07	73.1	62.32
565 C13e	ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2	M95667; M11730	60.91	66.39	59.13
577 C14c	tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein (TRAP1)	U12595	108.77	258.2	157.02
585 C14k	tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein (TRAP1)	U12595	157.97	266.38	206.73
840 E04n	tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein (TRAP1)	U12595	192.3	263.6	222.62
219 B02i	180-kDa secretory phospholipase A2 receptor precursor (PLA2 receptor; PLA2R)	U17033	76.65	94.62	95.1
782 D14l	180-kDa secretory phospholipase A2 receptor precursor (PLA2 receptor; PLA2R)	U17033	125.89	173.79	124.9
1103 F09k	180-kDa secretory phospholipase A2 receptor precursor (PLA2 receptor; PLA2R)	U17033	61.87	73.02	61.94
500 C08j	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3	U18321 + X83544	69.92	74.54	73.14

	(DAP3)					
569	C13i	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3	U18321 + X83544	73.67	103.73	87.32
	(DAP3)					
760	D13d	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3	U18321 + X83544	110.06	109.66	123.14
	(DAP3)					
15	A02a	ras-related protein RAB5C	U18420	113.58	112	128.61
762	D13f	ras-related protein RAB5C	U18420	169.84	164.24	222.5
939	E12a	ras-related protein RAB5C	U18420	154.69	171.68	163.67
113	A09a	EB1 protein	U24166	81.68	123.55	113.77
572	C13l	EB1 protein	U24166	133.49	274.14	231.58
978	E14l	EB1 protein	U24166	132.61	150.66	145.88
25	A02k	histone deacetylase 2 (HD2)	U31814	80.04	84.08	82.32
266	B05n	histone deacetylase 2 (HD2)	U31814	84.16	85.07	76.22
961	E13i	histone deacetylase 2 (HD2)	U31814	160.96	208.35	240.82
602	D01n	ataxia telangiectasia (ATM)	U33841	89.41	92.17	83.38
766	D13j	ataxia telangiectasia (ATM)	U33841	106.09	119.22	114.73
963	E13k	ataxia telangiectasia (ATM)	U33841	82.43	93.85	90.41
92	A07h	beta 3-endonexin	U37139	87.36	90.17	84.95
768	D13l	beta 3-endonexin	U37139	79.14	95.96	76.25
965	E13m	beta 3-endonexin	U37139	67.59	73.48	64.15
201	B01e	DNA topoisomerase III alpha (TOP3A)	U43431	177.93	209.31	225.42
798	E01n	DNA topoisomerase III alpha (TOP3A)	U43431	72.79	75.89	61.45
968	E14b	DNA topoisomerase III alpha (TOP3A)	U43431	66.81	70.44	58.64
42	A03n	serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	U48736	75.59	81.6	67.81
566	C13f	serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	U48736	66.77	79.83	73.28
571	C13k	serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	U48736	67.29	84.64	74.76
575	C14a	gamma-glutamyl hydrolase precursor (GGH; GH); folylpolygammaglutamyl hydrolase; gamma-glu-X carboxypeptidase; conjugase	U55206	59.37	68.58	62.47
897	E09a	gamma-glutamyl hydrolase precursor (GGH; GH); folylpolygammaglutamyl hydrolase; gamma-glu-X carboxypeptidase; conjugase	U55206	65.53	69.25	57.71
964	E13l	gamma-glutamyl hydrolase precursor (GGH; GH); folylpolygammaglutamyl hydrolase; gamma-glu-X carboxypeptidase; conjugase	U55206	64.81	72.13	59.79
212	B02b	MHC class I molecule; MHC class I subunit-related protein A (MICA); PERB11.1	U65416; U69631; X92841	86.24	82.25	77.85
302	B08h	MHC class I molecule; MHC class I subunit-related protein A (MICA); PERB11.1	U65416; U69631; X92841	124.39	148.22	127.81
1169	F14g	MHC class I molecule; MHC class I subunit-related protein A (MICA); PERB11.1	U65416; U69631; X92841	171.06	231.64	216.38

562	C13b	TSG101 tumor susceptibility protein	U82130	64.85	76.95	70.26
731	D11c	TSG101 tumor susceptibility protein	U82130	96.61	100.56	89.87
980	E14n	TSG101 tumor susceptibility protein	U82130	71.91	78.62	72.49
7	A01g	RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDI3	U82532	110.6	136.29	146.5
858	E06d	RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDI3	U82532	76.33	78.61	71.7
959	E13g	RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDI3	U82532	67.52	70.54	61.83
16	A02b	glutathione-S-transferase homolog	U90313	231.98	182.33	291.84
19	A02e	glutathione-S-transferase homolog	U90313	194.07	150.74	243.03
536	C11d	glutathione-S-transferase homolog	U90313	195.07	551.81	268.61
5	A01e	IkappaB epsilon (IKBE)	U91616	77.69	84.2	70.84
209	B01m	IkappaB epsilon (IKBE)	U91616	70.27	73.51	62.86
320	B09l	IkappaB epsilon (IKBE)	U91616	65.39	70.65	66.3
215	B02e	dihydrofolate reductase (DHFR)	V00507	86.61	100.09	93.06
630	D03n	dihydrofolate reductase (DHFR)	V00507	75.38	84.17	67.08
972	E14f	dihydrofolate reductase (DHFR)	V00507	171.93	207.6	108.1
765	D13i	transforming growth factor beta (TGF-beta; TGFB)	X02812; J05114	139.83	182.93	194.7
1112	F10f	transforming growth factor beta (TGF-beta; TGFB)	X02812; J05114	60.39	65.64	59.67
1163	F14a	transforming growth factor beta (TGF-beta; TGFB)	X02812; J05114	67.48	64.78	59.12
224	B02n	c-kit proto-oncogene; mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR); CD117 antigen	X06182	66.01	71.7	61.33
303	B08i	c-kit proto-oncogene; mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR); CD117 antigen	X06182	588.74	659.9	650
784	D13h	c-kit proto-oncogene; mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR); CD117 antigen	X06182	89.05	100.33	89.18
205	B01i	retinoic acid receptor alpha 1 (RAR-alpha 1; RARA); PML-RAR protein	X06538; X06614; M73779	102.91	185.33	174.8
457	C05i	retinoic acid receptor alpha 1 (RAR-alpha 1; RARA); PML-RAR protein	X06538; X06614; M73779	64	69.4	59.8
587	C14m	retinoic acid receptor alpha 1 (RAR-alpha 1; RARA); PML-RAR protein	X06538; X06614; M73779	138.79	226.93	245.2
213	B02c	ras homolog gene family member B (RHOB; ARHB); ARH6; H6	X06820	101.24	103.31	102.71
314	B09f	ras homolog gene family member B (RHOB; ARHB); ARH6; H6	X06820	85.33	96.61	76.33
763	D13g	ras homolog gene family member B (RHOB; ARHB); ARH6; H6	X06820	94.41	104.25	99.02
21	A02g	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	X14454	86.89	93.53	92.64
769	D13m	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	X14454	120.03	197.25	150.23
929	E11e	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	X14454	75.73	76.49	72.8
1	A01a	interleukin 9 precursor (IL9); T-cell growth factor p40	X17543; M30134	111.11	104.81	115.86
187	A14e	interleukin 9 precursor (IL9); T-cell growth factor p40	X17543; M30134	64.97	66.63	55.03

1158 F13k	interleukin 9 precursor (IL9); T-cell growth factor p40	X17543; M30134	66.93	81	62.14
28 A02n	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236	126.21	169.37	191.29
142 A11b	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236	71.23	68.08	57.36
579 C14e	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236	64.93	79.25	64.61
738 D11j	<i>rho</i> -related GTP-binding protein (RHOG); ARHG	X61587	78.17	80.87	64.14
954 E13b	<i>rho</i> -related GTP-binding protein (RHOG); ARHG	X61587	67.92	73.07	63.66
970 E14d	<i>rho</i> -related GTP-binding protein (RHOG); ARHG	X61587	178.44	204.74	93.84
115 A09c	DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA metase; MCMT)	X63692	70.74	73.32	58.5
223 B02m	DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA metase; MCMT)	X63692	67.18	69.46	57.45
1158 F13j	DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA metase; MCMT)	X63692	91.46	142.56	101.81
615 D02m	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	X66363	74.98	82.23	61.03
958 E13f	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	X66363	86.58	96.41	69.26
960 E13h	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	X66363	84.55	94.2	94.69
105 A08g	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDIA	X69550	99.79	110.49	113.17
761 D13e	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDIA	X69550	185.22	189.61	266.08
767 D13k	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDIA	X69550	90.64	115.17	111.13
218 B02h	uridine phosphorylase (UDRPase; UP)	X90858	66.14	71.3	62.84
513 C09i	uridine phosphorylase (UDRPase; UP)	X90858	64.04	67.69	68.57
1149 F13a	uridine phosphorylase (UDRPase; UP)	X90858	62.82	63.46	55.74
400 C01h	bleomycin hydrolase (BLM hydrolase)	X92106	64.69	80.84	69.24
774 D14d	bleomycin hydrolase (BLM hydrolase)	X92106	222.29	232.16	248.93
776 D14f	bleomycin hydrolase (BLM hydrolase)	X92106	244.87	276.91	253.14
570 C13j	<i>ras</i> -related protein RAB28	X94703	58.4	69.19	57.86
917 E10g	<i>ras</i> -related protein RAB28	X94703	65.02	69.33	58.32
974 E14h	<i>ras</i> -related protein RAB28	X94703	146.9	163.41	188.01
11 A01k	adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486	74.91	76.97	60.88
214 B02d	adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486	145.4	156.6	190.18
456 C05h	adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486	62.87	67.28	66.49
99 A08a	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604	84.32	107.96	121.88
778 D14h	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604	267.96	333.77	329.79

1161 F13m	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604	103.54	135.49	127.06
292 B07l	rab geranylgeranyltransferase alpha subunit (rab GG transferase; rab GGTase)	Y08200	67.23	65.72	59.12
962 E13j	rab geranylgeranyltransferase alpha subunit (rab GG transferase; rab GGTase)	Y08200	90.68	107.68	101.27
1156 F13h	rab geranylgeranyltransferase alpha subunit (rab GG transferase; rab GGTase)	Y08200	98.43	129.3	111.75

2. 旧フィルターアレイにおける対応遺伝子

NO	address	Gene	GenBank	obs1	obs2	obs3	TYPE
1056 F06f	MRP/organic anion transporter (MOAT-B)		AF071202	49.93	59.67	59.45	12
918 E10h	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 2 (DNMT2)		AJ223333	50.45	54.29	57.85	9
244 B04f	protein kinase C delta (PKC-delta)		D10495	52.38	56.22	60.33	2
732 D11d	interleukin 2 receptor gamma subunit (IL2R-gamma; IL2RG); cytokine receptor common gamma chain precursor		D11086	47.13	51.78	49.05	7
256 B05d	phospholipase C (PLCL)		D42108	44.98	50.79	50.36	2
958 E13f	microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1-6 precursor (UDPGT; UGT1.6; UGT1F; GNT1)		J04093	47.25	51.76	53.94	10
748 D12f	interleukin 7 (IL7)		J04156	50.76	54.83	51.86	7
536 C11d	matrix metalloproteinase 9 (MMP9); gelatinase B; 92-kDa type IV collagenase precursor (CLG4B)		J05070; D10051	50.37	54.57	59.45	5
123 A09k	c-fos proto-oncogene; GOS7 protein		K00650	51.5	60.26	54.75	2
482 C07f	peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR-alpha; PPARA)		L02932	50.77	54.3	58.8	4
838 E04l	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 (ERCC6); Cockayne syndrome protein 2 type B (CSB)		L04791	46.31	53.18	48.47	9
1033 F04k	heat shock 70-kDa protein 4 (HSPA4); HSP70RY; heat shock 70-related protein APG-2		L12723	109.3	162.89	117.49	11
627 D03k	focal adhesion kinase (FADK); proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2)		L13616	58.12	67.14	56.48	5
107 A08i	retinoblastoma-related protein p107		L14812	49.59	55.37	48.67	1
826 D03j	cadherin 8 (CDH8)		L34060	48.53	53.42	49.44	5
1060 F06j	sulfanylurea receptor (SUR); ATP-binding cassette subfamily C (CFTR/MRP) member 8 (ABCC8)		L78207	47.85	60.56	56.91	12
634 D04d	urokinase-type plasminogen activator precursor (U-plasminogen activator; UPA)		M15476; D00244	109.25	158.12	88.21	5
947 E12i	cytochrome P450 IID6 (CYP2D6)		M20403; M19697	62.59	66.19	66.73	10
707 D09g	erbB3 proto-oncogene; HER3		M29366; M34309	98.72	122.03	120.47	6

264	B05i	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1); ras-like protein TC25	M29870; M31467	71.53	102.13	99.2	3
835	E04i	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	61.94	69.94	79.37	9
682	D07j	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2)	M35410	54.76	55.93	54.53	6
878	E07j	X-ray repair-complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	M36089	58.85	64.71	65.04	9
759	D13c	interleukin 11 (IL11); adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	M57765	50.13	52.49	49.78	7
631	D04a	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	45.68	54.16	47.26	5
330	B10h	colorectal mutant cancer protein (MCC)	M62397	45.35	52.22	50.13	2
511	C09g	integrin beta 7 precursor (ITGB7)	M62880; S80335	48.56	50.49	54.54	5
218	B02h	ERBB2 proto-oncogene; NEU proto-oncogene; HER2	M95867; M11730	46.39	48.22	49.65	2
744	D12b	tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein (TRAP1)	U12595	123.01	128.36	123.5	7
252	B04n	180-kDa secretory phospholipase A2 receptor precursor (PLA2 receptor; PLA2R)	U17033	44.51	49.65	51.3	2
832	E04f	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3)	U18321 + X83544	55.81	66.14	68.87	8
291	B07k	ras-related protein RAB5C	U18420	93.66	125.57	113.8	3
332	B10j	EB1 protein	U24166	73.77	115.63	98.15	2
886	E08d	histone deacetylase 2 (HD2)	U31814	49.42	59.45	58.51	9
135	A10i	ataxia telangiectasia (ATM)	U33841	134.58	226.59	157.96	2
649	D05e	beta 3-endonexin	U37139	51.5	56.14	50.77	5
888	E08f	DNA topoisomerase III alpha (TOP3A)	U43431	50.53	57.87	55.38	9
368	B13d	serine/threonine protein kinase PRP4 homolog	U48736	47.51	53.66	54.03	2
1005	F02k	gamma-glutamyl hydrolase precursor (GGH; GH); fohlypolygammaglutamyl hydrolase; gamma-glu-X carboxypeptidase; conjugase	U55206	51.55	61.02	57.28	10
773	D14c	MHC class I molecule; MHC class I subunit-related protein A (MICA); PERB11.1	U65416; U69631; X92841	59.07	65.06	57.26	7
343	B11g	TSG101 tumor susceptibility protein	U82130	47.86	53.9	54.66	2
440	C04f	RHO GDP-dissociation inhibitor 3 (RHO-GDI 3); RHO-GDI gamma; ARHGDI3	U82532	43.18	49.86	54.6	4

1025 F04c	glutathione-S-transferase homolog	U90313	158.28	387.66	332.95	11
858 E06d	D kappa B epsilon (IKBE)	U91616	50.96	54.03	54.2	9
915 E10e	dihydrofolate reductase (DHFR)	V00507	51.46	60.56	56.53	9
698 D08i	transforming growth factor beta (TGF-beta; TGFB)	X02812; J05114	48.33	54.57	49.24	6
131 A10e	c-kit proto-oncogene: mast/stem cell growth factor receptor precursor (SCFR); CD117 antigen	X06182	50.01	54.86	51.94	2
304 B08j	retinoic acid receptor alpha 1 (RAR-alpha 1; RARA); PML-RAR protein	X06538; X06614; M73779	43.83	53.11	49.08	2
301 B08g	ras homolog gene family member B (RHOB; ARHB); ARH6; H6	X06820	63.67	72.7	64.22	3
771 D14a	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	X14454	46.12	55.7	49.83	7
737 D11i	interleukin 9 precursor (IL9); T-cell growth factor p40	X17543; M30134	49.12	52.53	50.99	7
1032 F04j	heat shock 70-kDa protein 6; heat shock 70-kDa protein B	X51757; M11236	51.67	62.82	59.96	11
428 C03h	rho-related GTP-binding protein (RHOG); ARHG	X61587	49.43	54.38	56.89	3
894 E08i	DNA cytosine-5-methyltransferase (DNA metase; MCMT)	X63692	48.84	55.42	52.67	9
345 B11i	serine/threonine-protein kinase PCTAIRE 1 (PCTK1)	X66363	52.6	61.98	60.95	2
425 C03e	RHO GDP-dissociation inhibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha (GDIA1); ARHGDI1	X69550	48.1	60.51	59.95	4
983 F01c	uridine phosphorylase (UDRPase; UP)	X90858	64.36	81	89.91	10
1042 F05f	bleomycin hydrolase (BLM hydrolase)	X92106	51.85	67.24	66.75	11
279 B06m	ras-related protein RAB28	X94703	47.43	50.13	50	3
982 E13j	adenine phosphoribosyltransferase (APRT)	Y00486	47.29	57.67	53.84	10
982 F01b	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase; nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase (NDK)	Y07604	112.79	135.9	131.1	10
448 C04n	rab geranylgeranyltransferase alpha subunit (rab GG transferase; rab GGTase)	Y08200	57.14	59.58	58.83	4

フィルターアレイの信頼性および抗癌剤感受性遺伝子に関する研究
分担研究者 竹内 正弘 北里大学大学院 薬学研究科 臨床統計部門 教授

研究要旨 フィルターアレイの信頼性に関する検討と、エストロゲンおよびタモキシフェン接触処理によって乳癌細胞株において発現に変化が生じる遺伝子の抽出を行なった。その結果、フィルターアレイの信頼性が比較的良好であることが明らかになった。また、タモキシフェン感受性が示唆される遺伝子が抽出された。

A. 研究目的

マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を臨床応用する際には、その結果の信頼性を評価することが重要である。なぜならば、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の信頼性を疑問視する意見が多く、また臨床応用においては、解析結果に混入する偏りや変動が過度に大きいと、患者の治療に悪影響を与えかねないからである。本解析の目的のひとつは、クロンテック社のフィルターアレイの信頼性に関する検討を行うことにある。本研究でクロンテック社のフィルターアレイを使用した理由は、他のアレイに比べてフィルターアレイが比較的大型であり、またアレイ上にスポットされているプローブ数が約 1000 個と少ないことから、より高い結果の再現性が期待されるからである。

また、乳癌細胞株に対する抗癌剤の影響はまだ未知の部分が多く、その遺伝子レベルでの解明が望まれている。特にホルモン治療薬における乳癌細胞株への遺伝子発現シグナル解析は重点的に研究が進められている領域であり、乳癌における抗癌剤の作用機序を理解する上で重要である。本研究のもうひとつの目的は、エストロゲンおよびタモキシフェン接触処理によって乳癌細胞株の発現に変化が生じる遺伝子を統計学

的に抽出することである。

B. 研究方法

1. 実験方法

本研究ではクロンテック社のアトラスフィルターアレイを使用して、代表的な乳癌細胞株に対してエストロゲンおよびタモキシフェン接触を行ったときの遺伝子発現変動を測定した。今回使用したアトラスフィルターアレイは 825 種類の遺伝子に関する発現情報を一度に測定することが可能である。本実験では BT474、MCF7、MDA-MB-231、SK-BR-3 という 4 種類の代表的な乳癌細胞株に対して、それぞれ 4 種類のエストロゲン接触処理を行った。4 種類の処理はそれぞれ、エストロゲンのみ接触、エストロゲンとタモキシフェン低用量に接触、エストロゲンとタモキシフェン高用量に接触、およびエストロゲンフリー（エストロゲン枯渇状態）である。従って、細胞株と処理の組み合わせは計 16 通りである。本実験ではアレイデータの信頼性を評価するために、この 16 通りの処理を 2 回繰り返して実施した。通常、アレイデータ解析における繰り返しは推定値の精度を高めるために行われるため、同一実験日に同一条件の実験を繰り返すが、今回の目的は信頼性の評価であることから、2 回の実

験はあえて実験日を変えて行った。アレイデータの信頼性はこれら 2 回の繰り返し実験における結果間のピアソン相関係数を計算することによって評価する。フィルターアレイは RI による単独標識を用いるため、本実験で使用したアレイの数は 32 枚である。実験の順序に伴う系統の変動を除去する目的で、本実験では各 16 種類の組み合わせに対するハイブリダイゼーション処理はランダム化した。従って、統計学的には、本実験は繰り返し数 2 の 4 細胞株×4 処理の要因実験とみなすことができる。表 1 は細胞株と処理の組み合わせを示したものである。なお、実験は単独の実験者によって行われ、RI 使用に関する制約から実験は 8 回に分けて行われた。

2. データの前処理

図 1 は細胞株と処理の 16 種類の組み合わせにおける遺伝子発現強度の散布図である。横軸は 1 回目の実験における遺伝子発現強度、縦軸は 2 回目の実験における発現強度である。この図より、実験間で発現強度の位置と尺度が大きく変化していること、および発現強度の分布が右上に大きく裾を引くことがわかる。このようなデータに対してはピアソンの相関係数を用いても信頼性を妥当に評価することはできず、また、後述する薬剤感受性遺伝子の抽出においても、統計解析上困難が生じる。従って、統計解析のためには位置・尺度の調整だけではなく、適当な変数変換が必要である。

図 2 は遺伝子発現強度の遺伝子毎の平均と標準偏差について、散布図をとったものである。大きな点はデータ系列に対する移動平均である。図より、平均強度の増加に

伴って標準偏差が著しく増加することがわかる。

各組み合わせの発現強度が比較可能になるように尺度を調整し、かつ平均強度とその標準偏差が無関係になるようにデータを変換することにより、エストロゲン接触関連遺伝子を統計学的に抽出することが比較的容易になる。通常のマイクロアレイ解析では、データに対して対数変換を施し、平均値あるいは中央値を用いて正規化を行なうのが一般的である。しかし、本データにおいて上記の正規化を試みたところ、以前として平均強度とその標準偏差に強い相関が認められるため、従来の方法とは異なる正規化の手法が必要になる。

本解析では、Huber(2002)による正規化および分散安定化変換の手法をフィルターアレイのデータに対して適用した。アレイ $i(=1, \dots, m)$ における遺伝子 $j(=1, \dots, n)$ の発現強度を x_{ij} とする。アレイ i における位置および尺度の調整用パラメータをそれぞれ o_i と s_i とする。このときデータの変換を、

$$x_{ij} \propto z_{ij} = o_i + s_i x_{ij}$$

で定義する。一般性を失わず $o_i=0$ と $s_i=1$ とすることができるので、推定すべきパラメータ数は $2m-2$ 個である。次に分散を安定化させるために、発現強度の平均と標準偏差にモデルを仮定する。図 2 より、平均と標準偏差には線形関係が仮定できるので、この場合の分散安定化変換は、

$$h(y_{ij}) = \operatorname{arcsinh}(a_i + b_i y_{ij})$$

として得ることができる。ここで $a_i=a+bo_i$ 、 $b_i=bs_i$ であり、 a と b は分散安定化に用いるパラメータである。 a_i 、 b_i の推定はプロファイル尤度法で行なった。ここで、当フィルターアレイデータの解析にはオープンソー

スの統計解析ソフトウェアである R、およびその遺伝子データ解析パッケージである Bioconductor を使用した。

3. 薬剤感受性遺伝子の抽出

次に、エストロゲン接触によって発現強度に違いが生じる遺伝子を統計的に抽出した。解析は Scholtens and Gentleman のアプローチに基づいて行なった。当実験における発現強度データを y_{ijkl} とする。ここで i は遺伝子 ($i=1, \dots, 825$)、 j は細胞 ($j=1, \dots, 4$)、 k は処理 ($k=1, \dots, 4$)、 l は繰り返し ($l=1, 2$) とする。当実験の発現強度データに対して、下記の分散分析モデルを遺伝子毎に適用した。

$$y_{ijkl} = \mu_i + C_{ij} + T_{ik} + CT_{ijk} + e_{ijkl}$$

ここで μ_i は主効果、 C_{ij} は細胞の効果、 T_{ik} は処理の効果、 CT_{ijk} は細胞と処理の交互作用である。次に、処理効果 T_{ik} の検定を行なうために次の帰無モデルを用いた。

$$y_{ijkl} = \mu_i + C_{ij} + e_{ijkl}$$

処理効果の p 値は F 検定で導出した。また、細胞と処理の交互作用 CT_{ijk} の検定を行なうために、次の帰無モデルを当てはめた。

$$y_{ijkl} = \mu_i + C_{ij} + T_{ik} + e_{ijkl}$$

発現強度データには依然として実験間で系統的な影響が生じていたことが探索的な検討から判明したため、実際の解析では上記の全てのモデルに実験の効果 E_m ($m=1, \dots, 8$) を加えて解析を行なった。従って、解析に用いたモデルはそれぞれ下記の通りである。

$$y_{ijkl} = \mu_i + E_m + C_{ij} + T_{ik} + CT_{ijk} + e_{ijkl}$$

$$y_{ijkl} = \mu_i + E_m + C_{ij} + e_{ijkl}$$

$$y_{ijkl} = \mu_i + E_m + C_{ij} + T_{ik} + e_{ijkl}$$

上記の解析では一度に 825 回の F 検定を

行なうため、検定の多重性の問題が当然生じる。多重性の問題を考慮するために、本解析では Benjamini and Yekutieli (2001) の多重比較法を用いた。Benjamini and Yekutieli 法（以下 BY 法と略す）は任意の従属関係を持つ検定統計量から得られた p 値に対して、試験全体の第一種の過誤ではなく、False Discovery Rate（以下 FDR）を調整する多重比較法である。V を誤って棄却した真の仮説の数、R を棄却した仮説の数としたとき、確率変数 Q を次のように定義する。

$$Q = \begin{cases} V/R & R > 0 \text{ のとき} \\ 0 & \text{その他} \end{cases}$$

このとき、FDR は Q の期待値 $E(Q)$ である。つまり、棄却された仮説に真の仮説が含まれる割合の期待値である。

任意の従属関係をもつ n 個の検定統計量から得られた n 個の p 値を p_1, p_2, \dots, p_n とする。これらの p 値を小さい順に並べ変えたものを $p_{(1)}, p_{(2)}, \dots, p_{(n)}$ としたとき、

$$k = \max \left\{ i : p_{(i)} \leq \frac{i}{n} \frac{1}{\sum_{l=1}^n (1/l)} q \right\}$$

を計算し、 $p_{(1)}, p_{(2)}, \dots, p_{(k)}$ に対応する仮説を棄却する。この検定方式によって、FDR は q 以下に調整される (Benjamini and Yekutieli, 2001)。なお本研究では FDR の基準値として 0.05 を選択した。

次に探索的な目的（仮説発見）のために、タモキシフェン介入に伴って系統的に変動する遺伝子発現プロファイルを各細胞株毎に解析する。解析においては平均値に関する線形傾向性検定を用いた。線形対立仮説を表現する線形対比、

$$L = \sum_k^K c_k \bar{Y}_k$$

に対する検定を考える。ここで k は処理を示す因子の水準数であり、線形対比はそれぞれ $c_1=-3$ 、 $c_2=-1$ 、 $c_3=1$ 、 $c_4=3$ である。このとき検定統計量は、

$$T = \frac{\sum_{k=1}^4 c_k \bar{Y}_k}{\sqrt{10\hat{\sigma}^2}}$$

であり、帰無仮説のもとで自由度 4 の t 分布に従う。この検定を細胞株毎、遺伝子毎に適用する。なお本解析では仮説発見の目的のため、多重性の調整は行っていない。

上記の解析結果を視覚的に明確化するために、ボルケーノプロットを描画した。ボルケーノプロットは横軸に検定統計量の分子、縦軸に p 値の対数の負値をプロットしたものである。本解析においては、図の右側に位置する遺伝子は介入に伴って発現が増加する傾向を、左側は減少する傾向を示す。

C. 研究結果

1. データの前処理

図 3 は分散安定化変換後の各遺伝子の平均強度と標準偏差の関係を示す図である。図 3 より、分散安定化変換を行うことで、標準偏差は平均強度によらずほぼ一定になっていることがわかる。これより、本データに Huber の分散安定化手法を用いることで、通常の分散分析など、当分散性を仮定する解析手法を適用することが妥当であることが分かった。

図 4 は分散安定化変換後の実験間の散布図である。図 4 より、データの重心は各散布図の中心にほぼ位置していることがわか

り、変数変換前の右上への裾の広さが解消されていることがわかる。これにより、分布の非対称性に影響されやすい、正規分布を仮定した統計解析手法を本データに適用することが妥当であることが示された。

2. フィルターアレイの信頼性検討

本実験で使用したフィルターアレイの信頼性を検討するために、上記の分散安定化変換後のデータに対して、ふたつの実験間における発現強度のピアソン相関係数を各組み合わせ毎に計算した（表 2）。なお、分布の非対称性はピアソン相関係数に大きく影響することから、分散安定化前のデータに対してピアソン相関係数を計算することは望ましくないことを注記する。解析の結果、いずれの細胞と処理の組み合わせにおいても、ピアソン相関係数は 0.8 以上の値を示した。今回の実験のように、マイクロアレイ間で別々のハイブリダイゼーションを行なった場合、対応する発現強度間の相関は 60% から 80% であるという報告があり（Churchill, 2002）、それを考慮すると、この結果はフィルターアレイの信頼性が他のアレイに比べて高水準であることを示唆している。

3. 薬剤感受性遺伝子の抽出

Huber の分散安定化変換によってアレイデータの非対称性と不等分散性がほぼ解消されたので、先に紹介した分散分析法と対比を用いた方法を本データに対して適用した。分散分析に関しては、BY 法によって検定の多重性を調整した場合、主効果および交互作用の検定のいずれにおいても $k=0$ であり、残念ながら、処理および処理と細胞

の交互作用に関して、統計的な発現差をもつ遺伝子は検出されなかった。参考までに未調整 p 値が 0.01 未満の遺伝子を表 3 および表 4 に列挙する。また、これら遺伝子において、特徴的な変動を示した p21-activated kinase alpha の発現プロファイルを図 5 に示す。

図 5 において、物理的あるいはタモキシフェンによるエストロゲン接触低下によって、MCF7 と BT474 で p21-activated kinase alpha の発現が増加していることがわかる。p21 の発現は細胞周期の進行を遅延させ、またアポトーシスを誘発させることが知られている。一方で、MDA-MB-231 と SK-BR-3 ではこのような傾向性をみることはできなかった。MCF7 と BT474 はエストロゲン陽性細胞株であり、一方で MDA-MB-231 と SK-BR-3 はエストロゲン陰性細胞株であることから、タモキシフェンの介入によってエストロゲン陽性細胞株のみの p21 の発現が促進され、細胞周期の進行遅延およびアポトーシス誘導が生じる可能性が示唆された。

次に探索的解析の結果を示す。乳癌細胞株の各種類に対して、線形対比を用いた解析を適用し、ボルケーノプロットを用いて顕著な変動がみられた遺伝子群を列挙した。本研究では探索的に、p 値の対数の負値が 2 以上の遺伝子を選択した。ここで、細胞株の各種類について個別に線形傾向性の検定を行ったため、各検定でのサンプルサイズは 8 である。残念ながら有意水準 5% で統計的に有意な遺伝子は抽出されなかったが、これはサンプルサイズの小ささに起因するものである可能性が高い。もちろん、本解析で探索的に抽出した遺伝子には第一種の

過誤の危険性があり、あくまでも仮説発見のための情報であることを注記する。

図 6 は MCF 7 細胞株におけるボルケーノプロットであり、表 5、表 6 はその結果から抽出した遺伝子群である。表 5 はタモキシフェンの用量増加に伴って遺伝子発現に増加傾向がみられる遺伝子群であり、表 6 は減少傾向がみられる遺伝子群である。Multidrug resistance-associated protein や cytokeratin に関連した遺伝子が比較的多く抽出されていることがわかる。これらの傾向性は図 7 と図 8 で確認できる。

次に BT474 細胞株について検討を行った。図 9 は BT474 細胞株のボルケーノプロットであり、表 7、表 8 は抽出された遺伝子群である。Metalloproteinase やプロテインキナーゼに関連する遺伝子群が多く抽出されていることがわかる。これらの傾向性は図 10 および図 11 で確認できる。

続いて、図 12 のプロットより SK-BR-2 細胞株に対して遺伝子を抽出した。表 9、表 10 はそのリストである。Cadherin や ras 関連遺伝子に発現変動が生じているのがわかる。これらの傾向性は図 13 と図 14 に図示した。

最後に、MDA-MB-231 細胞株におけるボルケーノプロットを図 15 に示した。表 11、表 12 は抽出された遺伝子群である。Ras に関連した遺伝子群が多く抽出されていることがわかる。これらの遺伝子の傾向性は図 16 と図 17 を参照されたい。

D. 考察

本研究の目的は、フィルターアレイの信頼性に関する検討を行い、かつ乳癌細胞株においてタモキシフェン刺激により遺伝子

発現変動が生じる遺伝子を抽出することであった。その結果、フィルターアレイの信頼性は他のアレイに比べて高いことがわかった。しかし、今回の実験では乳癌細胞株を用いたため、結果の再現性は実際の臨床検体を用いたときよりも良好であることが容易に予想される。そのため、フィルターアレイを用いた発現解析においても、実験の精度を出来る限り高め、かつ信頼できるデータ解析手法を模索することが重要であろう。特に、臨床検体を採取する方法は結果に対して直接的な影響を与えることが予想されるため、詳細な検討が必要となるであろう。

今回の実験では、フィルターアレイの信頼性を検討することを主目的としたため、実験日を変えて同一条件での遺伝子発現解析の繰り返しを行った。しかし、もし薬剤感受性遺伝子の抽出を主目的とするならば、結果の精度を向上させるために、同一実験時に同一条件の遺伝子発現解析を繰り返した方がよいであろう。但し、今回の結果から、実験間における結果の変動が予想以上に大きいことが分かったため、今後の実験においてはこれらの問題を考慮する実験計画を考慮することが大切である。特に、RIがどの程度新しいものであるかが結果に大きく影響することが今回の解析結果から示唆される（非公開）ことから、実際の実験担当者と統計家が協力してデータの品質管理を行っていくことが大切だと思われる。

今回実験に使用したフィルターアレイのスポット数は 1000 スポットであり、他のマイクロアレイに比べるとスポット数は少なめである。そのため、このフィルターアレイを用いることができる対象はある程度限

定され、他のアレイと如何に使い分けを行うかが新たな課題として考えられるであろう。

E. 結論

今回の研究を行った結果、クロンテック社のフィルターアレイから得られたデータに対して Huber の分散安定化変換が有効であることと、その信頼性は他のアレイに比較して高いことが分かった。また、エストロゲンおよびタモキシフェン接触処理によって乳癌細胞株において発現に変化が生じる遺伝子は、統計的に有意なものは抽出できなかったが、それを示唆する遺伝子の抽出を行うことが出来た。本実験で抽出された遺伝子群に対して、フィルターアレイによる追加実験やノーザンブロット法などを用いることにより、抗癌剤感受性遺伝子に対して、より検証的な知見が得られるであろう。

参考文献

- Benjamini Y and Yekutieli D (2001), The control of the FDR multiple testing under dependency, *Annals of Statistics*, 29, 1165-1188.
- Churchill GA (2002), Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays, *Nature Genetics*, 32 Suppl., 490-495.
- Huber W, von Heydebreck A, Suelmann H, et al. (2002), Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression, *Bioinformatics*, 18 Suppl., S96-S104.

厚生労働科学研究費補助金（平成 15 年度萌芽的先端医療技術推進 研究事業）
分担研究報告書

Scholtens D and Gentleman R, Estrogen
2 × 2 factorial design, a Vignette of
Bioconductor, 1-12.

"Latin Square Design to Gene Expression
Experiments," ISMB 2003 Conference
June 29th - July 3rd, 2003, Brisbane,
Australia. (Poster)

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

無し

G. 研究発表

T. Hamano, A. Ohide, M. Sekijima, K.
Nishio, M. Takeuchi, Y. Fujiwara (2003)

資料 5 ホルモン療法関連遺伝子マーカーの選択

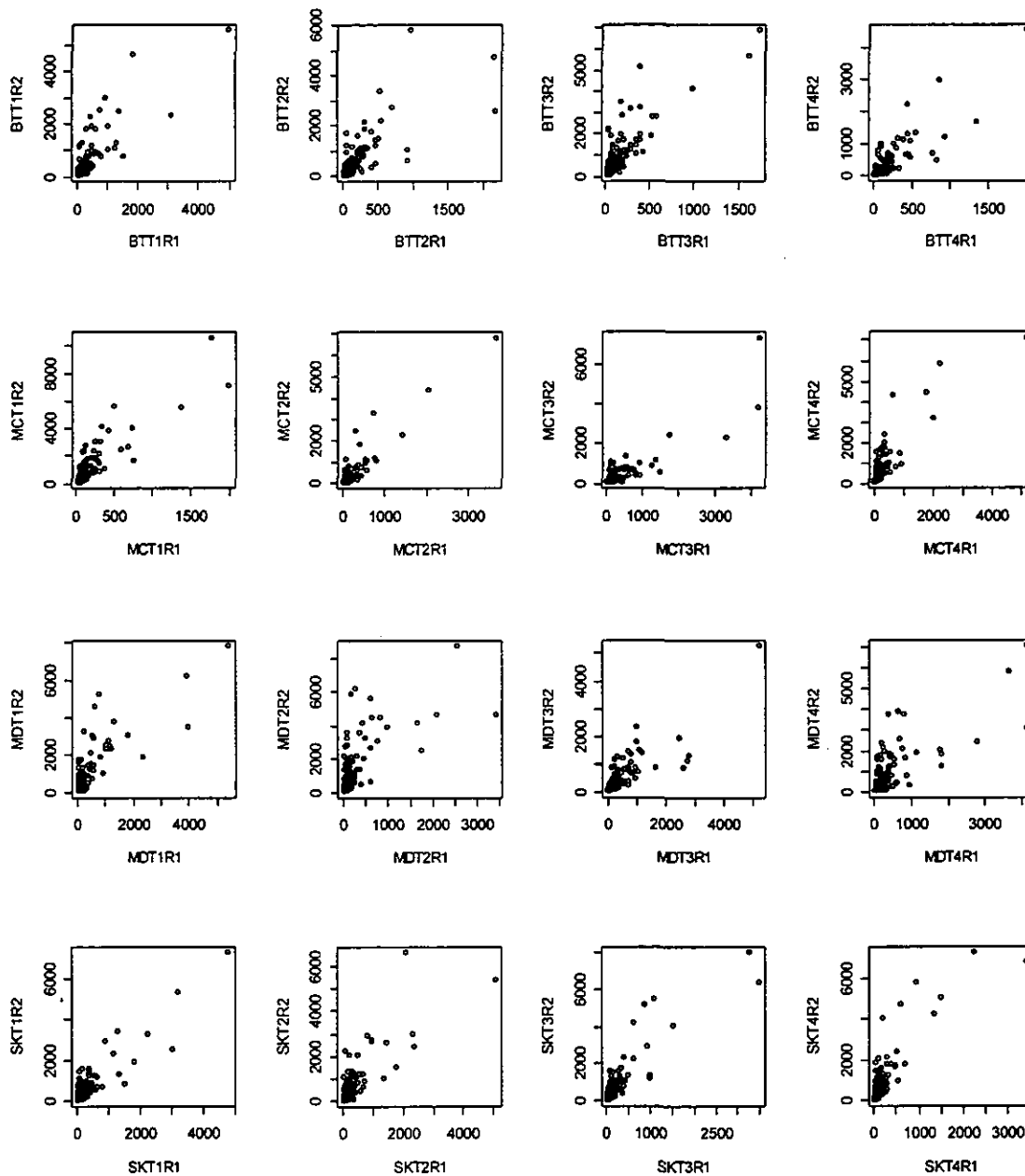


図 1 16 種類の実験組み合わせにおける遺伝子発現強度の散布図
 横軸と縦軸はそれぞれ 1 回目と 2 回目の実験における発現強度