

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ができなかった。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 MCF7 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際の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

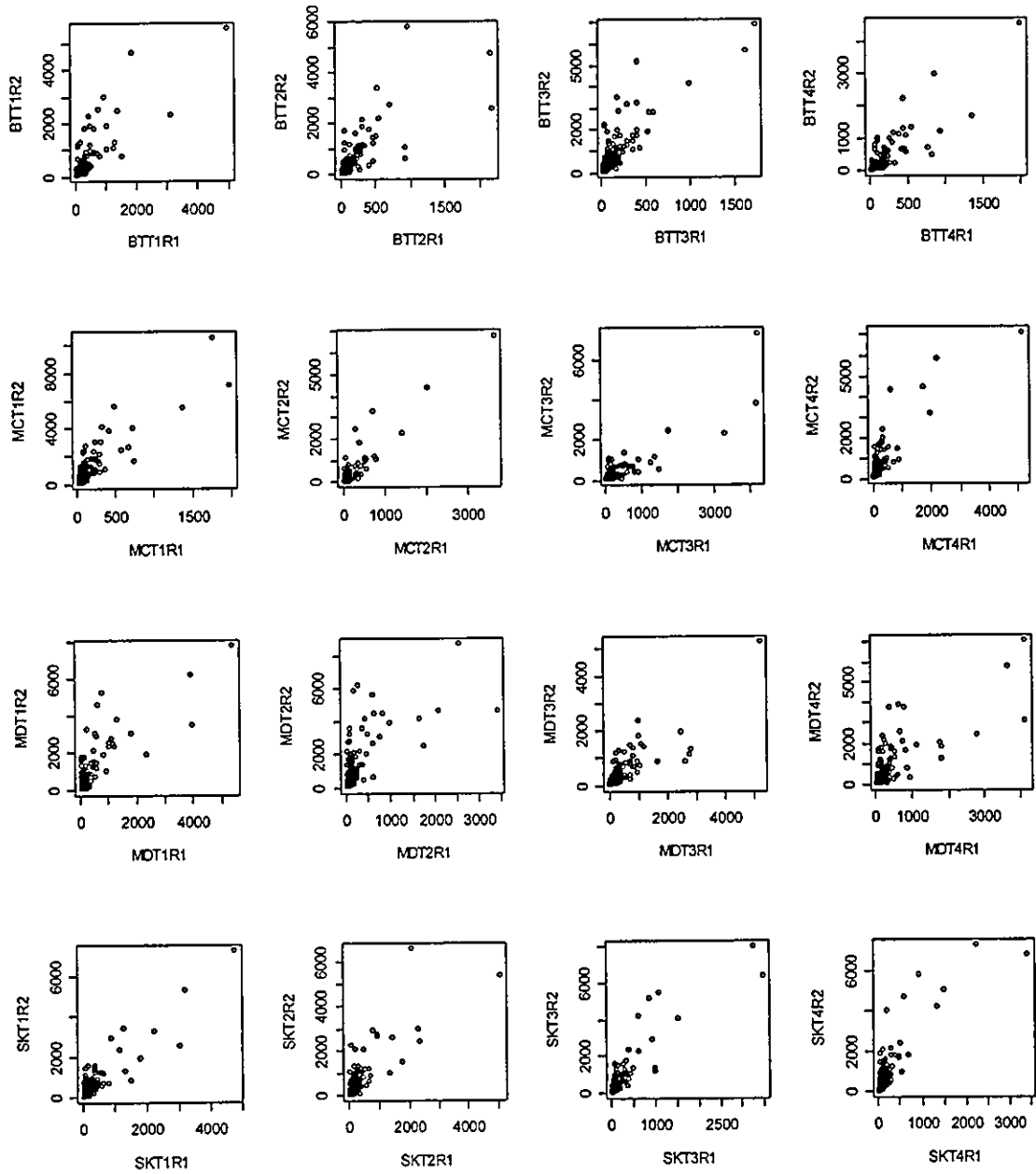


図 1 16 種類の実験組み合わせにおける遺伝子発現強度の散布図
横軸と縦軸はそれぞれ 1 回目と 2 回目の実験における発現強度

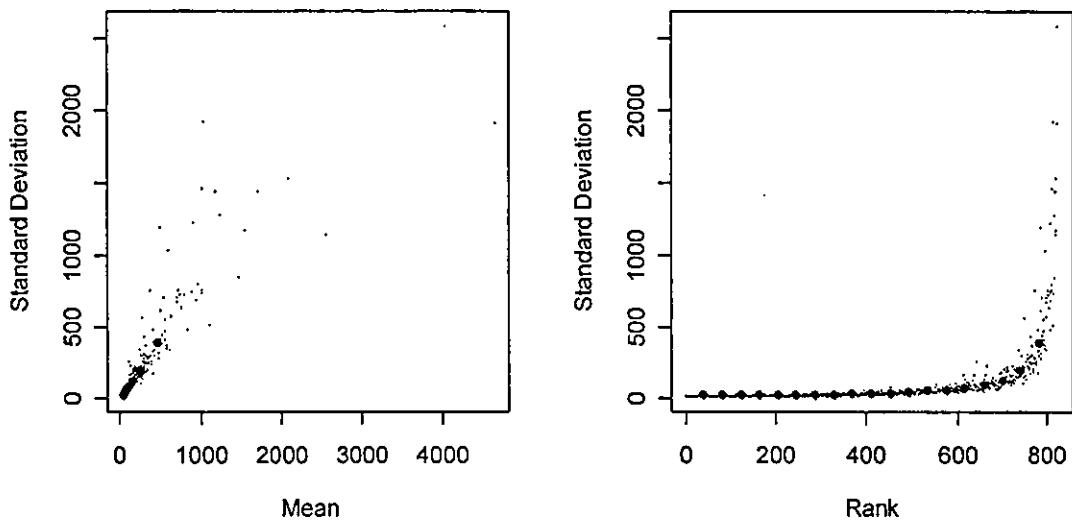


図 2 各遺伝子の平均強度と標準偏差の散布図

左図の横軸は平均強度、右図の横軸はその順位、大きな点は系列の移動平均

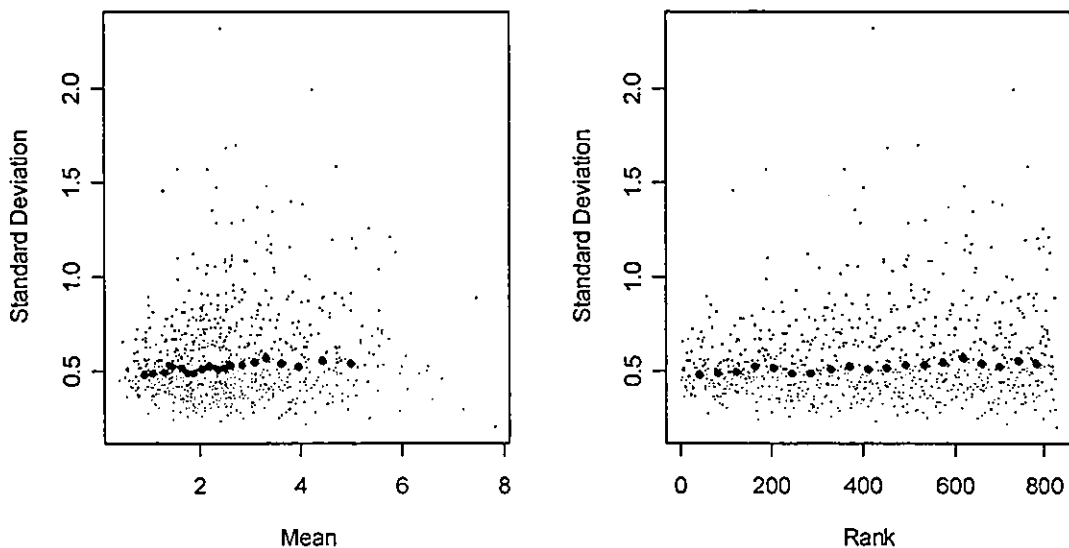


図 3 分散安定化変換後の各遺伝子の平均強度と標準偏差の散布図

左図の横軸は平均強度、右図の横軸はその順位、大きな点は系列の移動平均

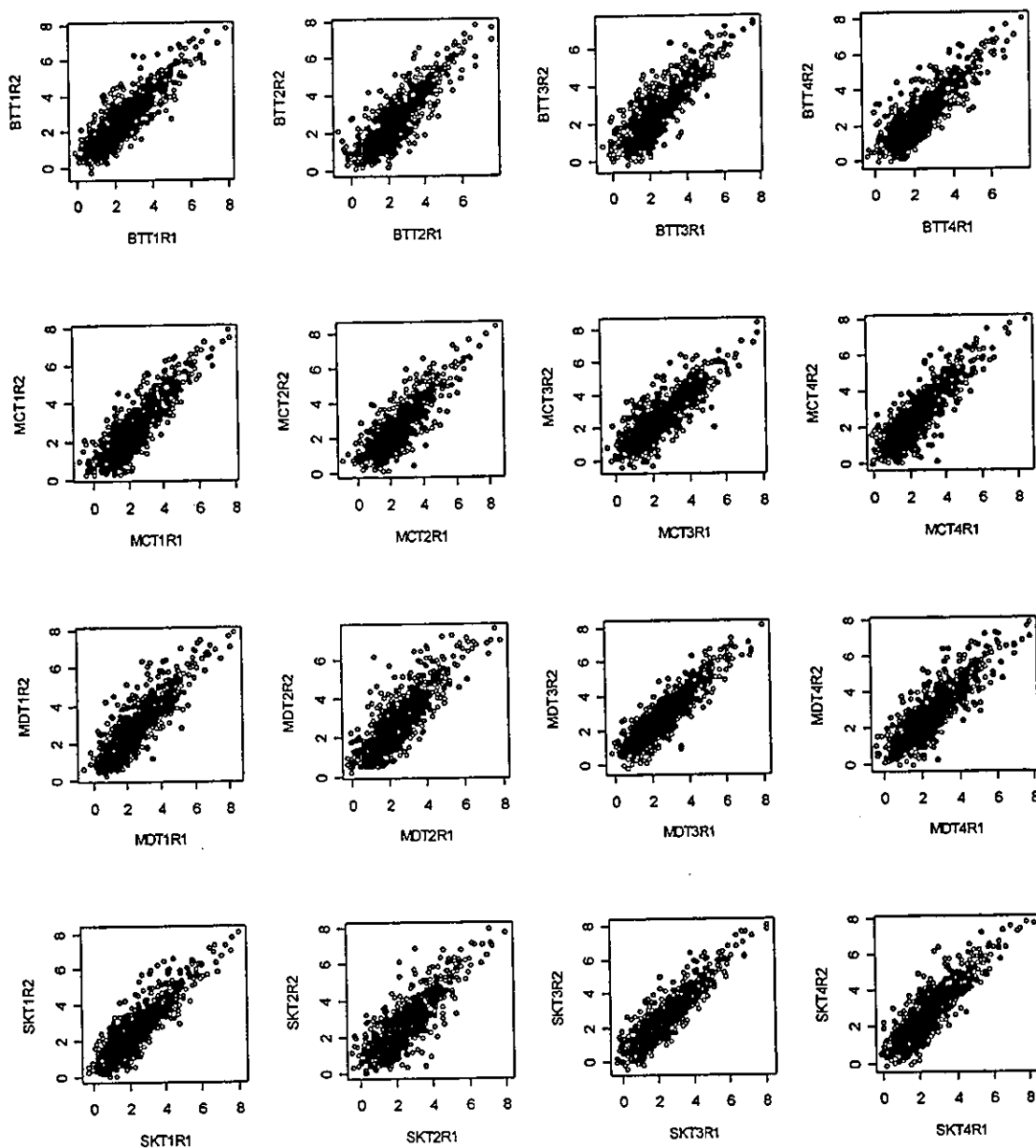


図 4 分散安定化変換後の遺伝子発現強度の散布図

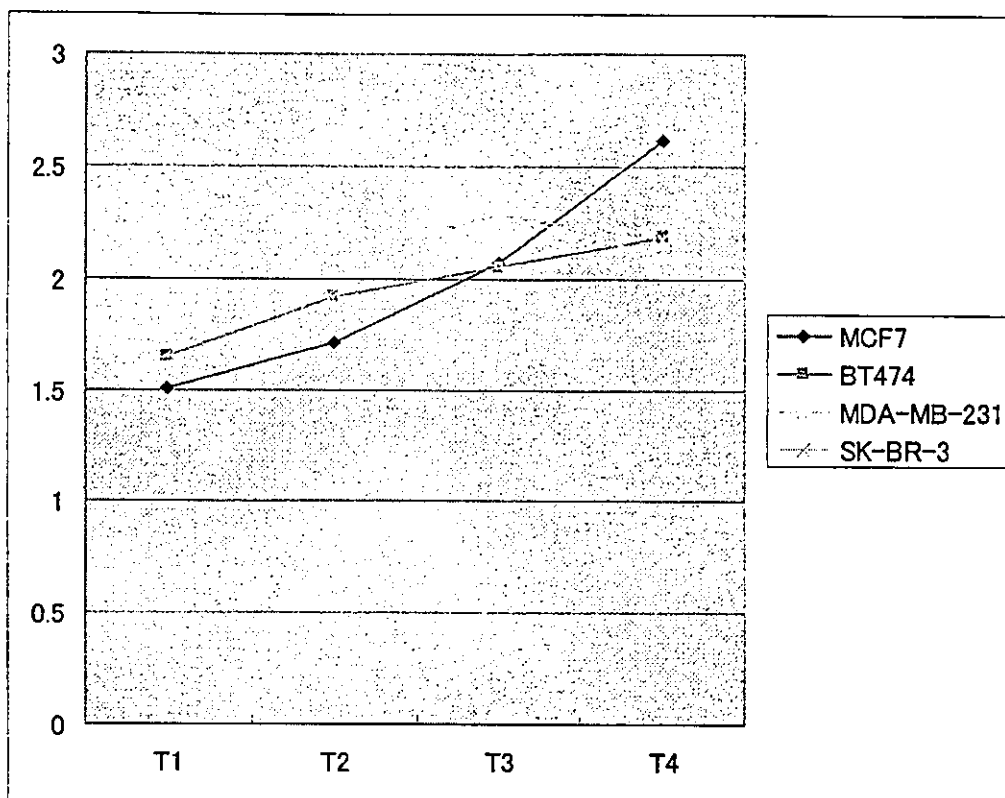


図 5 p21-activated kinase alpha の発現プロファイル
データ点は 2 回の実験繰り返しにおける平均値

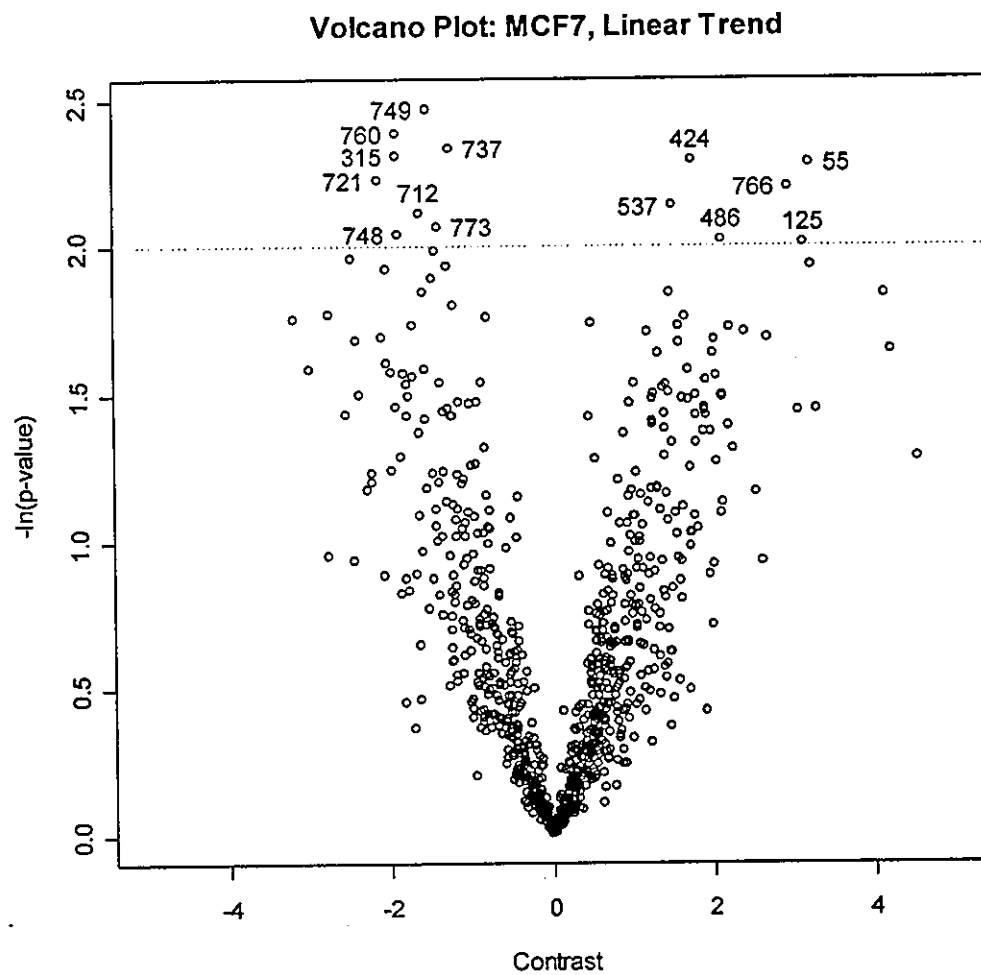


図 6 MCF7 細胞株におけるボルケーノプロット

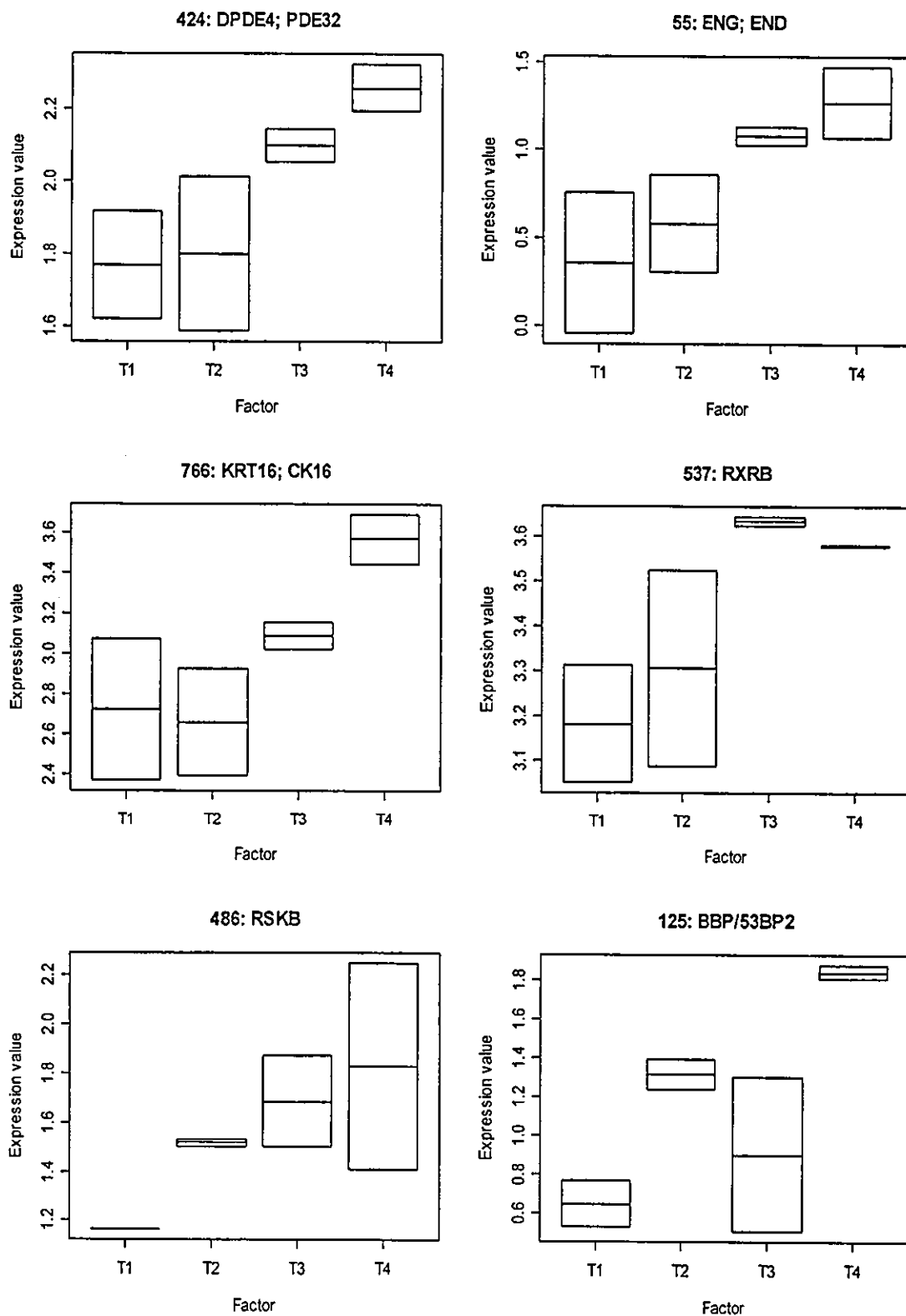
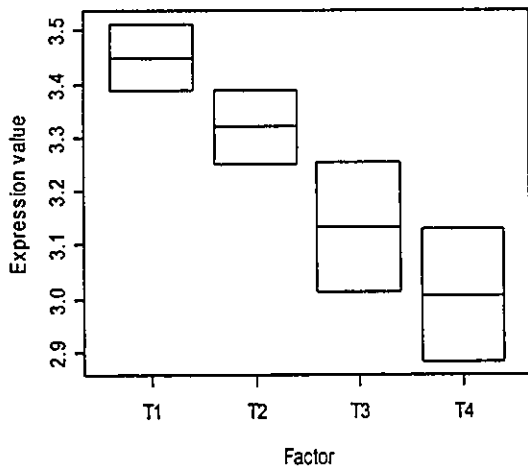
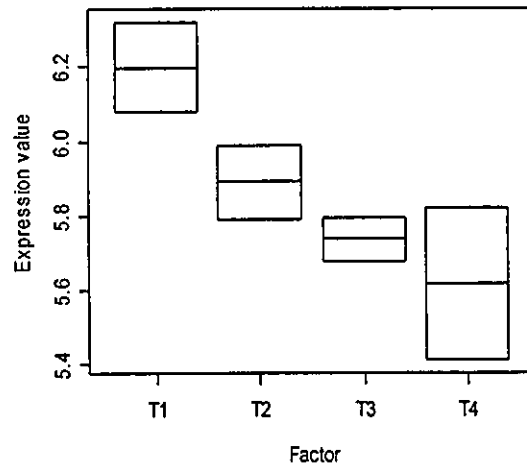


図 7 MCF7 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット
(箱の上下はデータ点、中線は平均値)

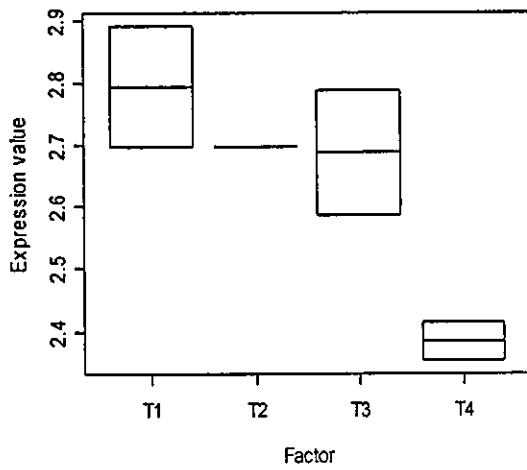
749: MRP3; MLP2; ABCC3



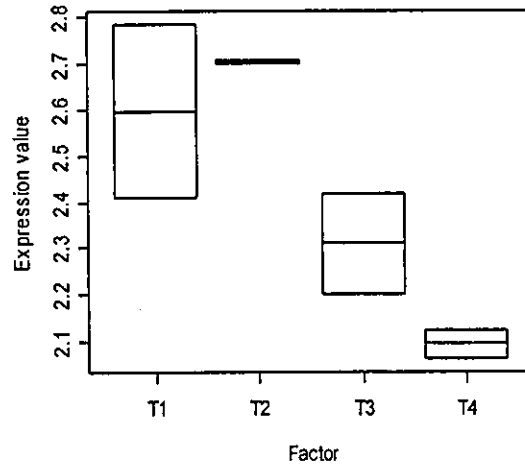
760: TC4



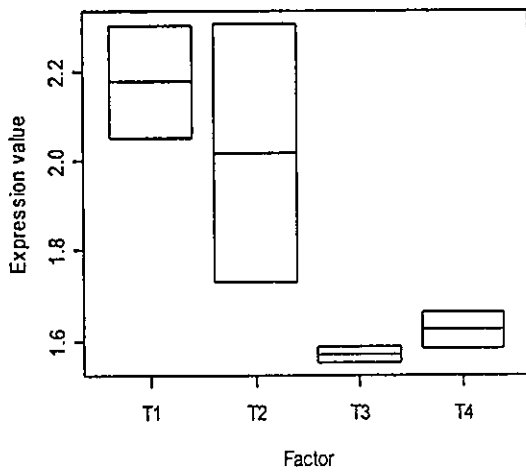
737: thioredoxin reductase



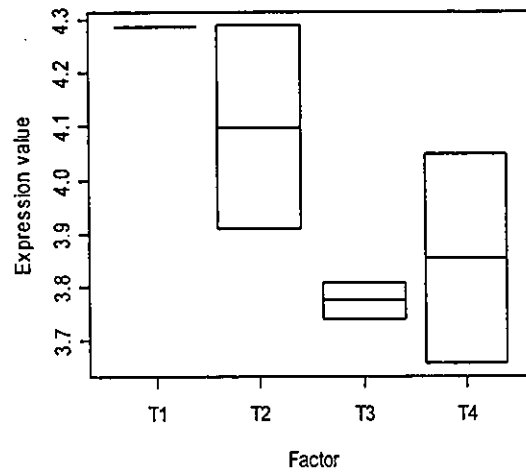
315: farnesyltransferase beta



721: GSHPX1; GPX1



712: adducin gamma subunit



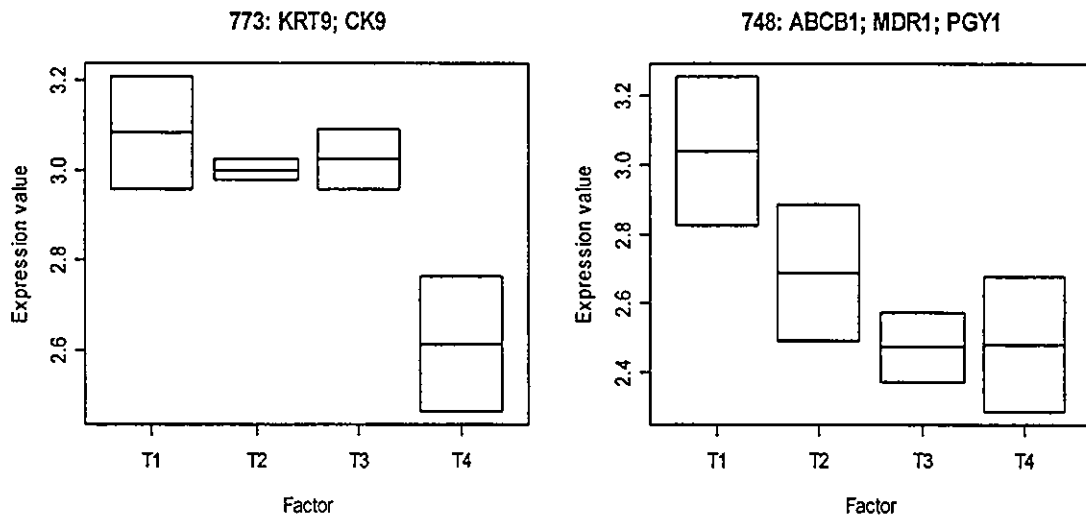


図 8 MCF7 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット
(箱の上下はデータ点、中線は平均値)

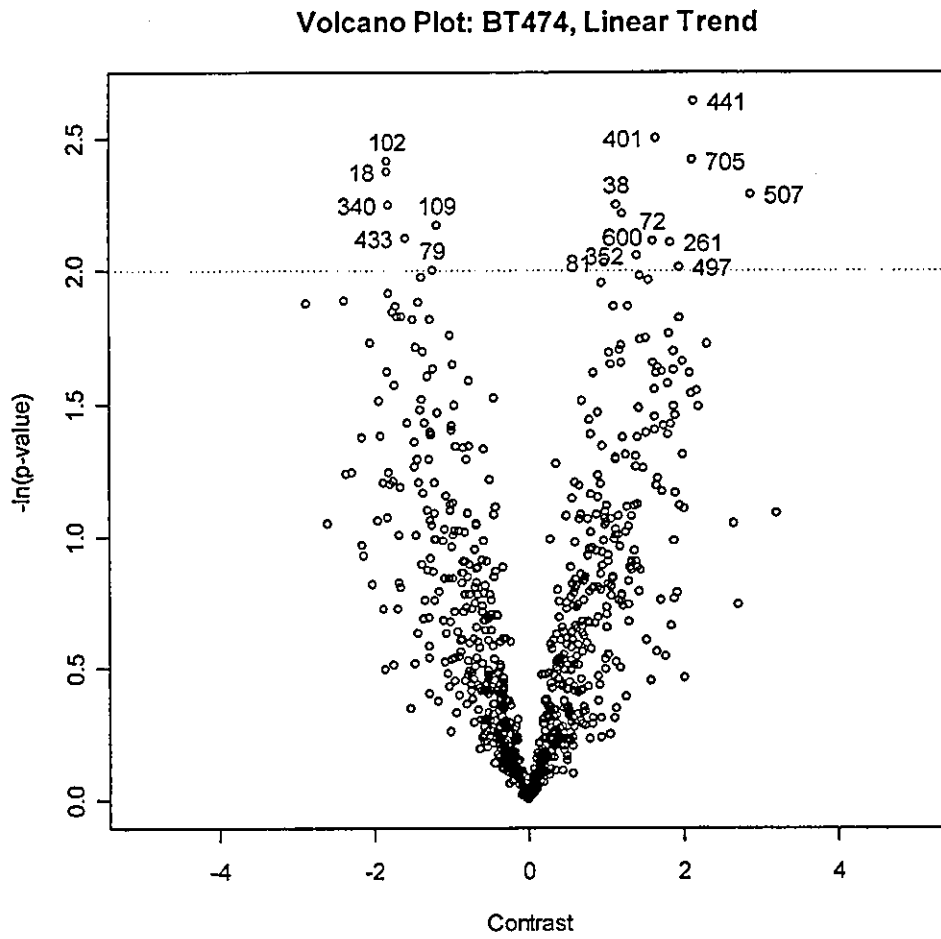
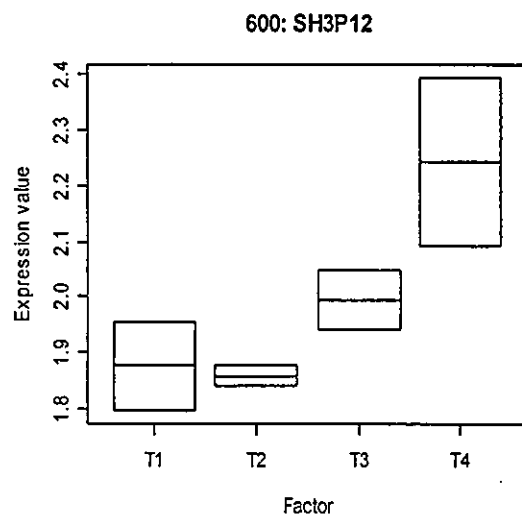
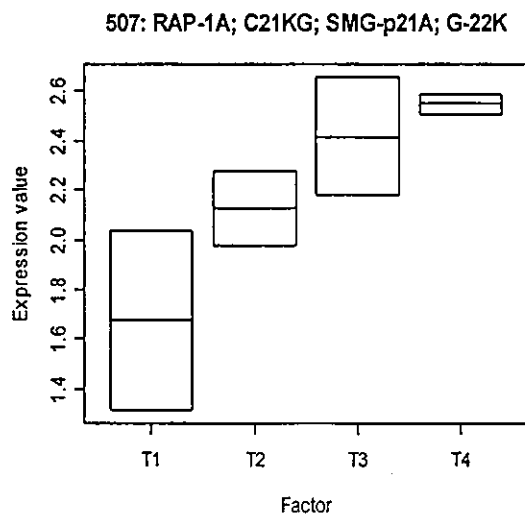
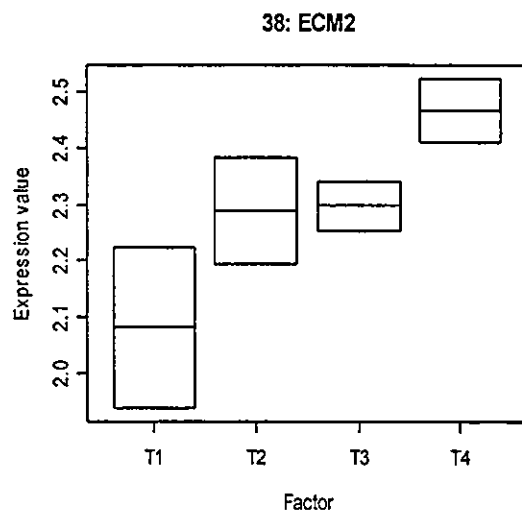
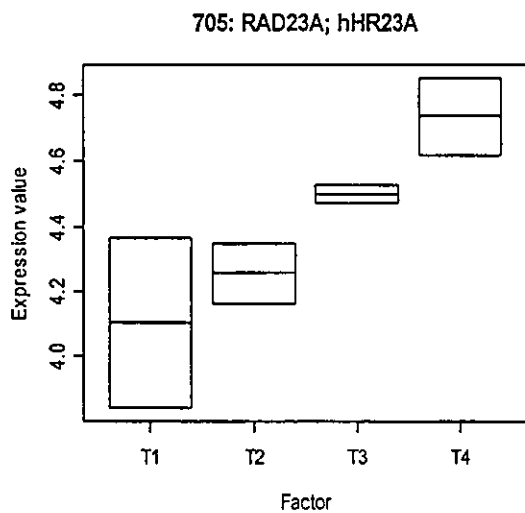
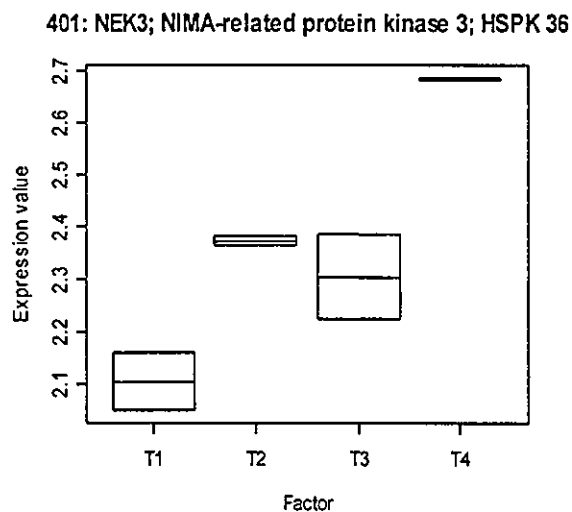
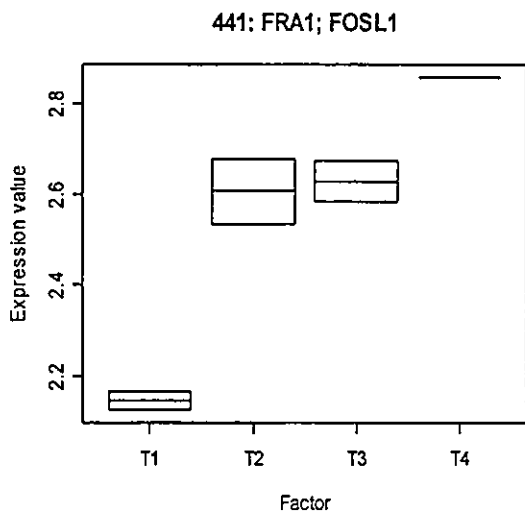


図 9 BT474 細胞株におけるボルケーノプロット



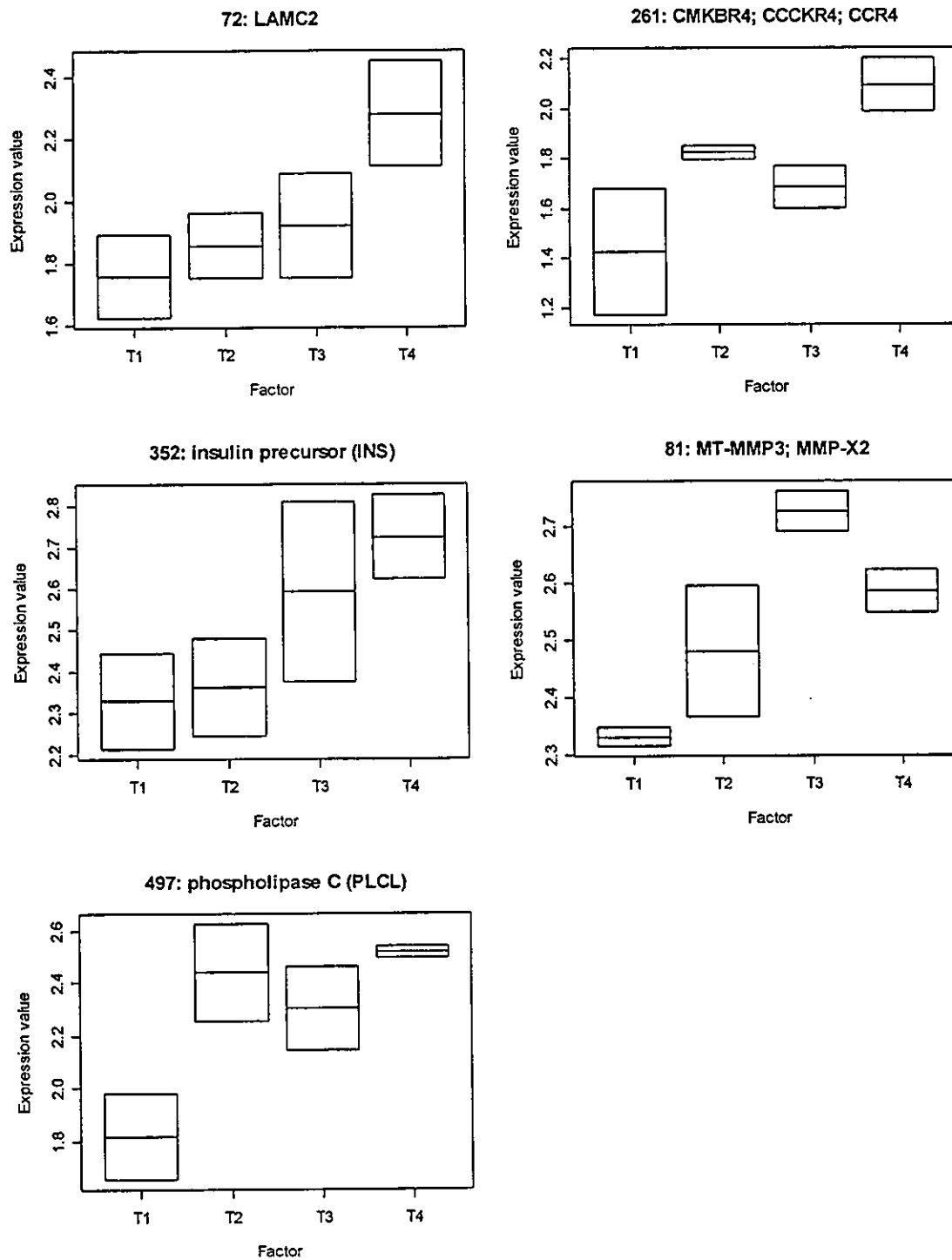


図 10 BT474 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット
 (箱の上下はデータ点、中線は平均値)

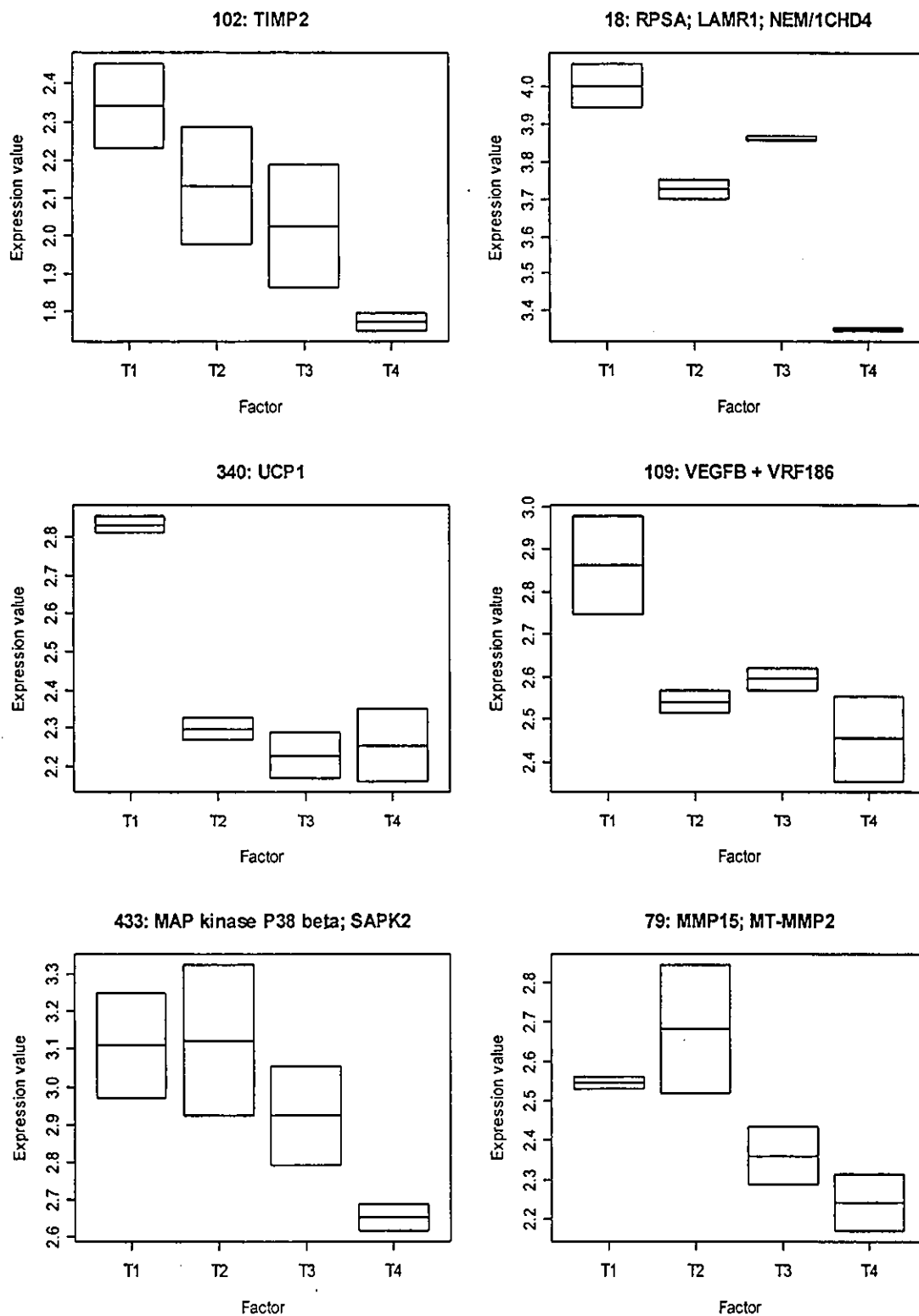


図 11 BT474 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット
 (箱の上下はデータ点、中線は平均値)

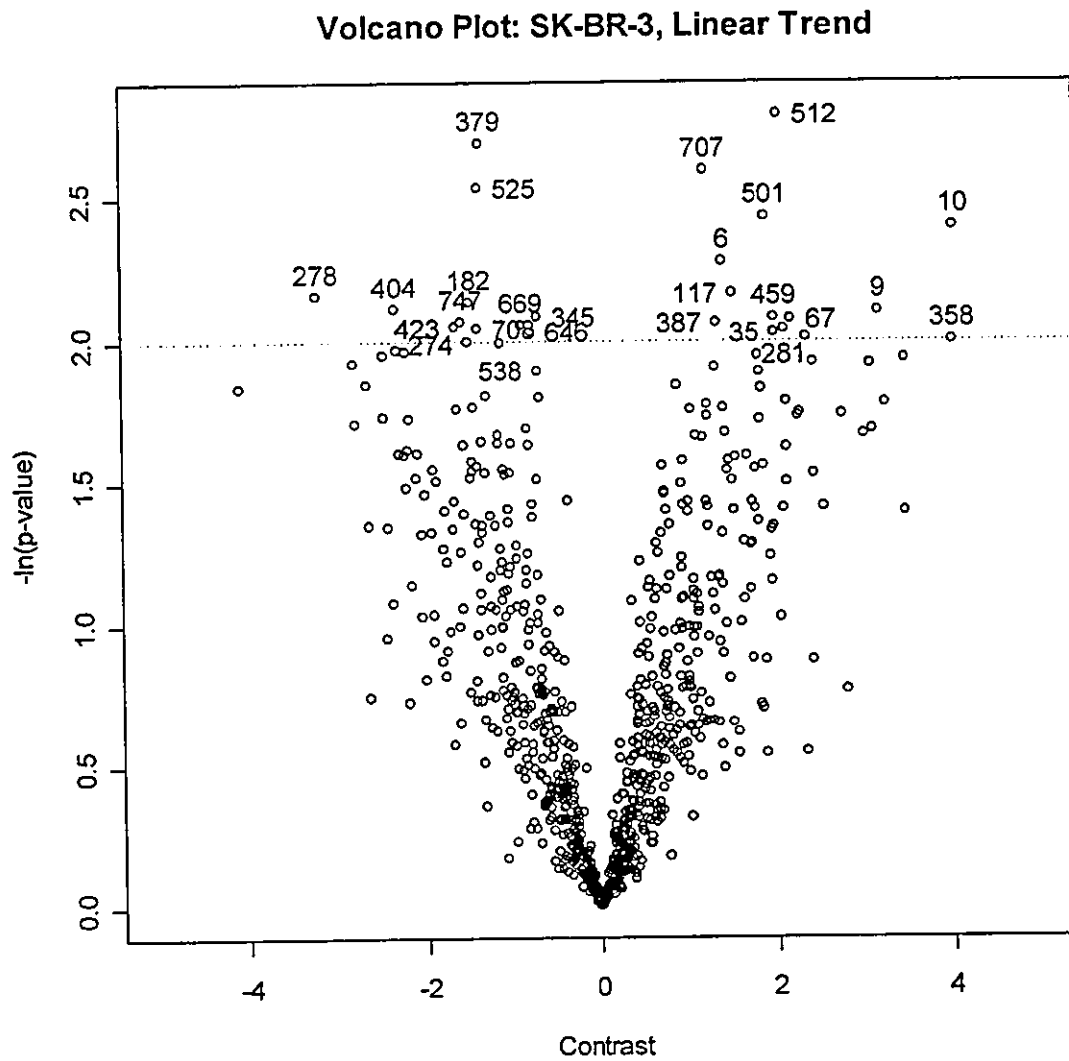
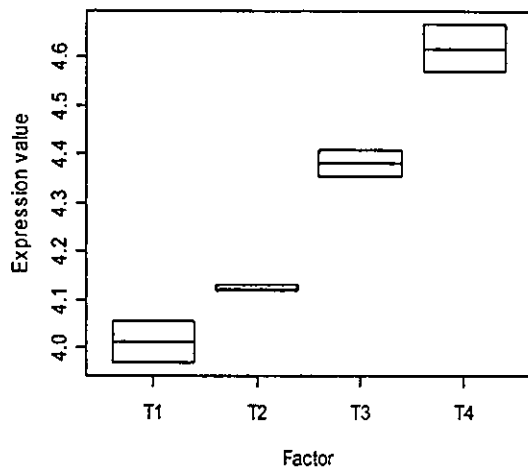
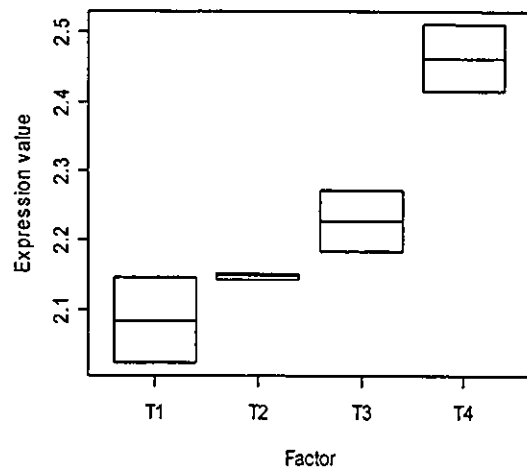


図 12 SK-BR-3 細胞株におけるボルケーノプロット

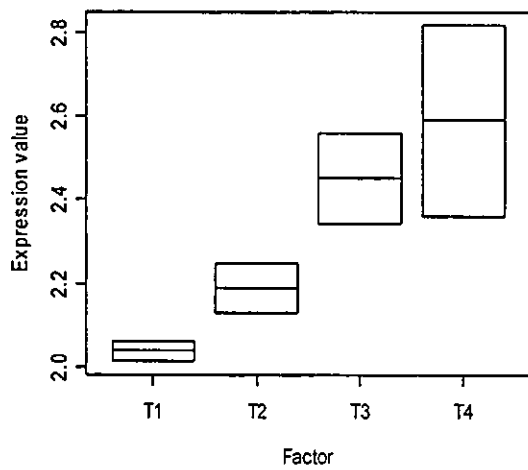
512: RAB1A; YPT1-related protein



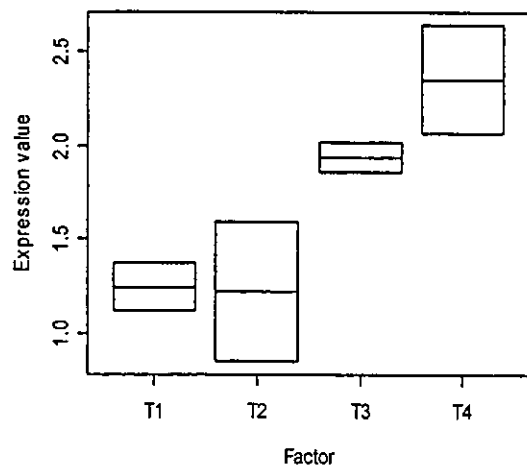
707: GNRP; ras-GRF; sos



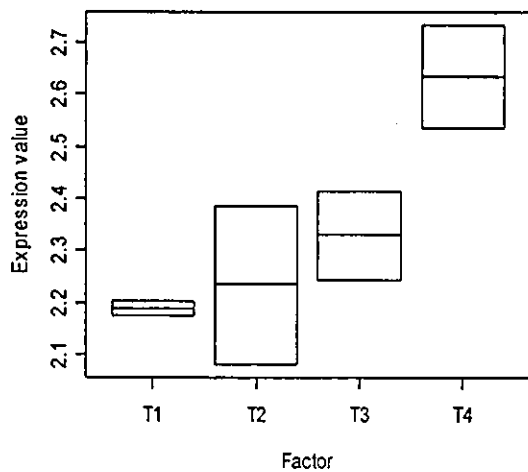
501: PLC-delta 1; PLCD1; PLC-III



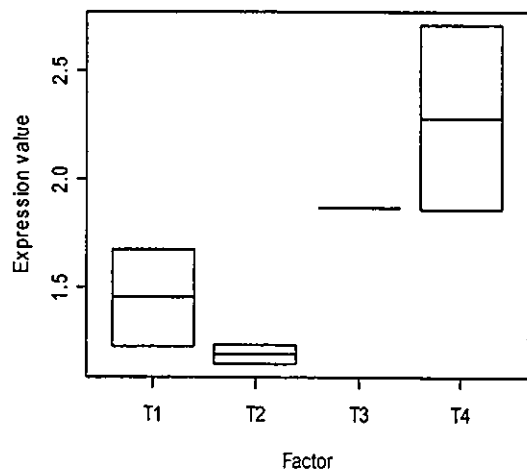
10: cadherin 8 (CDH8)



6: cadherin 11 precursor (CDH11); OSF4



9: cadherin 4 (CDH4); RCAD



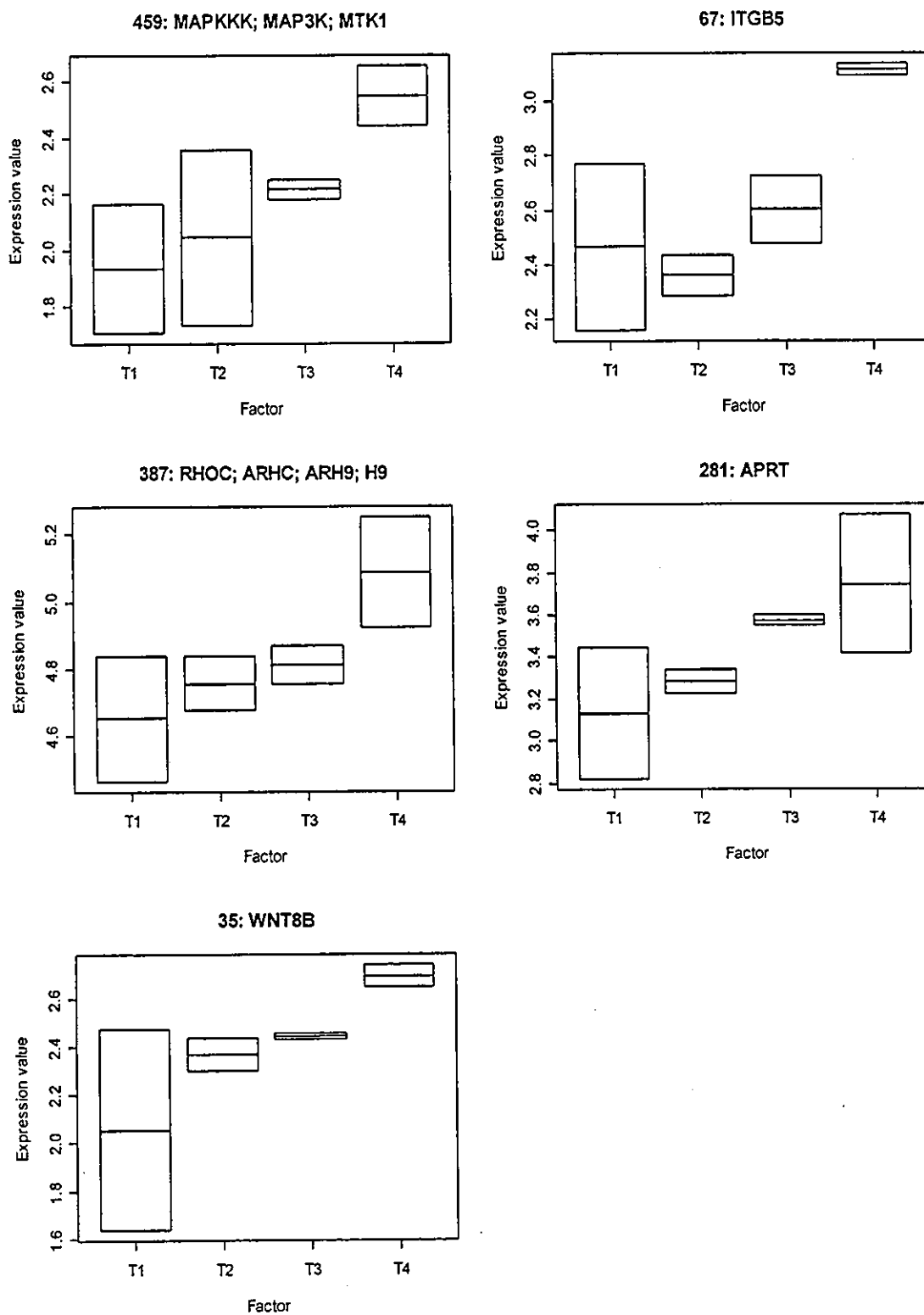
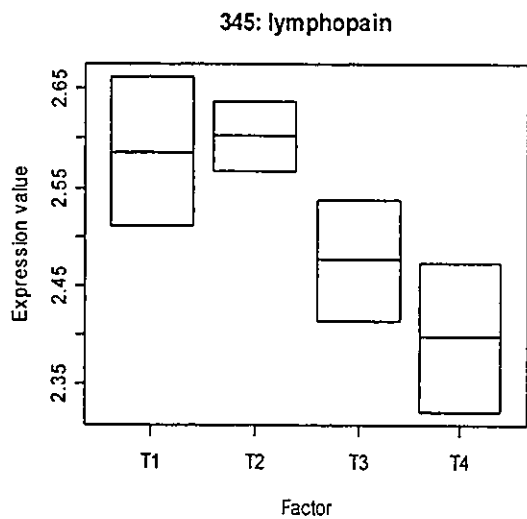
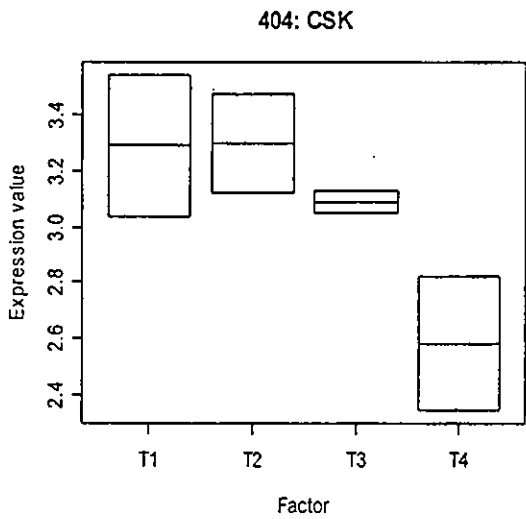
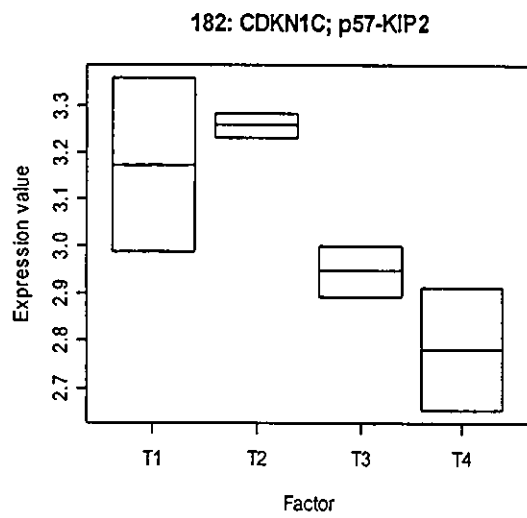
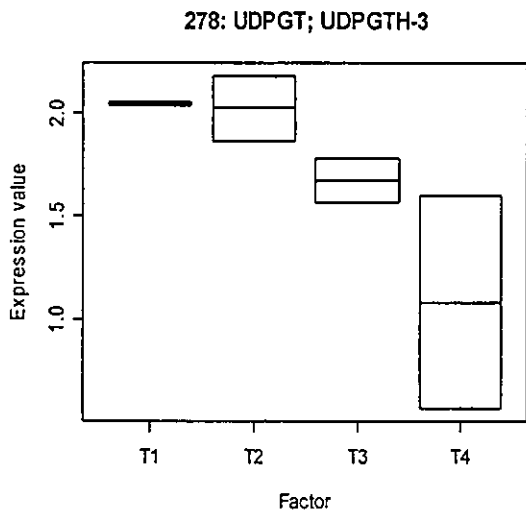
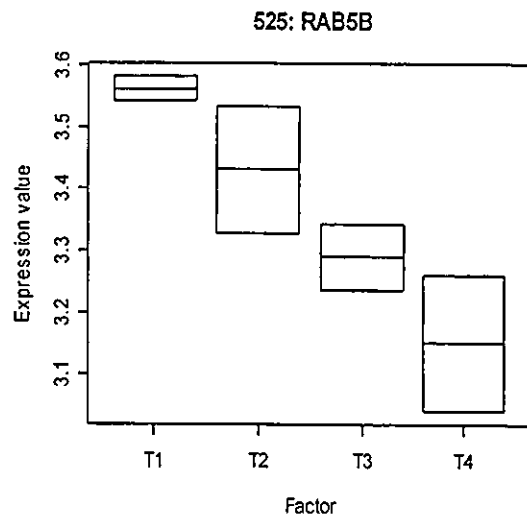
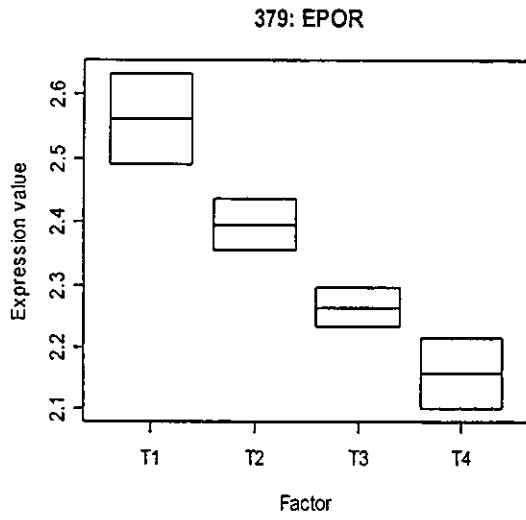


図 13 SK-BR-3 細胞株における増加傾向遺伝子のプロット
 (箱の上下はデータ点、中線は平均値)



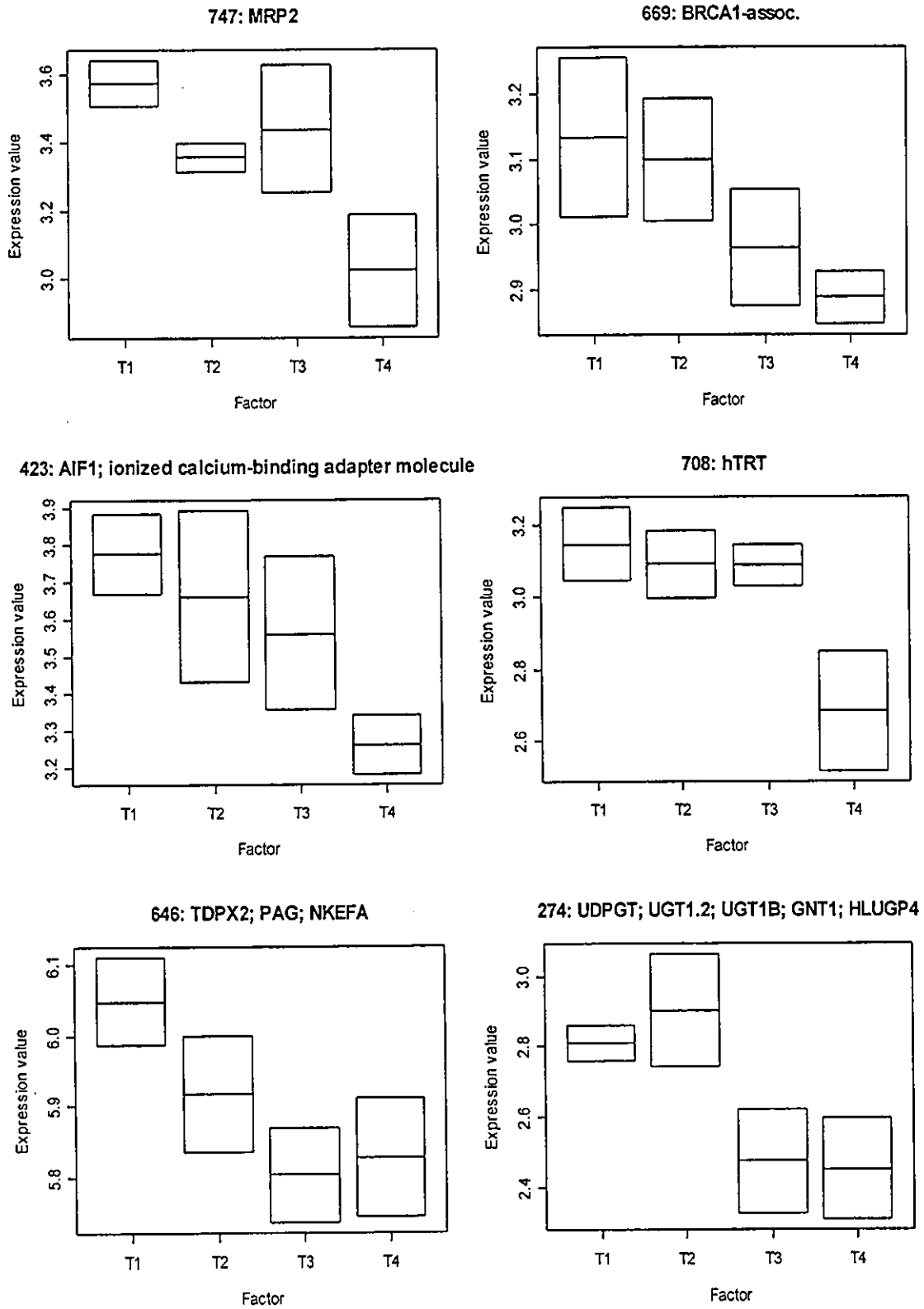


図 14 SK-BR-3 細胞株における減少傾向遺伝子のプロット
 (箱の上下はデータ点、中線は平均値)