

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業
システム生物学的的方法論による癌の
バイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん-一般-012)

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 後藤 典子

平成20 (2008) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索 （ H19-3次がん- 一般-012 ）に関する研究	----- 3
後藤典子 （資料）研究報告書（後藤）	
II. 分担研究報告	
1. システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索 （ H19-3次がん- 一般-012 ）に関する研究	----- 11
河野 隆志 （資料）研究報告書（河野）	
2. システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索 （ H19-3次がん- 一般-012 ）に関する研究	----- 15
黒田 雅彦 （資料）研究報告書（黒田）	
3. システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索 （ H19-3次がん- 一般-012 ）に関する研究	----- 18
宮野 悟 （資料）研究報告書（宮野）	
4. システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索 （ H19-3次がん- 一般-012 ）に関する研究	----- 20
平野 隆 （資料）研究報告書（平野）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23

I. 総括研究報告

システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん- 一般-012) に関する研究

主任研究者 後藤 典子

東京大学医科学研究所 システム生命医科学技術開発共同ユニット 准教授

研究要旨

システム生物学的方法論を駆使することによって、癌を統合的に理解することにより、新規バイオマーカー及び革新的分子標的の発見を目指す。特にHERファミリー分子の異常が関わる癌に注目し、本研究の基本実験と位置づけた。既に未報告のバイオマーカー候補分子が複数見いだされるとともに、候補分子の絞り込みのためのバイオインフォマティクス技術の開発を行った。また、プロテオミクス並びにゲノム解析や、ncRNAの解析、さらに癌幹細胞の解析も組み合わせることにより、癌の統合的理解へより一層近づける研究体制へと整備を行った。

分担研究者氏名・所属機関及び所属機関における職名

河野 隆志 国立がんセンター研究所 生物学部 室長

黒田 雅彦 東京医科大学 病理学部 准教授

宮野 悟 東京大学医科学研究所 DNA情報解析分野 教授

平野 隆 東京医科大学 呼吸器外科 准教授

A. 研究目的

本研究では、生命現象をシステムとして理解することを目指す「システム生物学」的方法論を駆使して、癌という疾病を統合的に理解することを目指す。その研究成果からは、これまでの方法論では発見されずにおかれた重要な新規バイオマーカー及び革新的分子標的が発見されることが期待されるので、これらを用いて癌の超早期診断及びテーラーメイド医療に資することを目指す。

ここ十数年、分子生物学的手法を用いた要素還元的アプローチから、癌の分子機構の解明が大きく進展した。しかし、臨床の現場では、乳癌や肺癌の罹患率はむしろ増加し、治療後の生存率も著明な改善は示していない。癌の罹患率及び死亡率を激減させるためには、この基礎研究と臨床とのギャップを克服し、基礎研究の成果を臨床へつなげて、新たなバイオマーカーによる診断技術の向上、革新的分子標的の同定、それを標的とする抗がん剤の開発によって、テーラーメイド医療を実現することが必要である。このような背景のもと、申請者らは、細胞内で異常なシグナル伝達系が活性化することによって、発癌、癌細胞の増殖、周辺組織への浸潤、及び転移へと動的に変化していく癌という疾病を統合的に

理解することが重要であると考えている。そのために、最近新しい分野として確立しつつある、システム生物学を癌の生物学に取り入れ、展開することによって、それが可能であることに注目している。

固形癌において、現在臨床で使用されている分子標的治療薬は、ハーセプチンやイレッサに代表されるHERファミリーを標的にしたものに限られており、その適応を決定するバイオマーカーの開発が急務になっている。本研究ではまず、HERファミリー分子の異常が関わる癌を統合的に理解する研究を進める(後藤、河野、宮野、平野)。中でも、イレッサ感受性と高い相関を示すHER1遺伝子の変異が、肺腺癌の約40%にあり、これはアジア人、非喫煙者に多いという特徴があることから、本研究は、特に日本で推進すべき課題とに注目している。後藤、河野は、トランスクリプトームの解析を軸とした研究、平野はプロテオームの解析、及びゲノム解析を中心に行い、宮野がバイオインフォマティクスを担当する。さらに、乳癌幹細胞及び肺癌幹細胞を取り出し、これらが増殖因子により制御されるパスウェイの統合的理解を目指す(後藤、河野)。現在正常細胞の癌幹細胞化は、癌化の最も初期におこり、これを制御するシグナル伝達系の解明は、癌の超早期診断に有用なバイオマーカー及び革新的分子標的の抽出につながると期待される。

近年、ゲノム上に相当数のnon-coding RNA (ncRNA)がコードされていると推測され、生体機能を理解する上でncRNAの機能解析は不可欠と言われる。また、癌を誘発する要因としてncRNAの変異を視野に入れる必要性が指摘されている。そこで、ゲノムワイドなsiRNA/miRNAレンチウイルスライブラリーの作製を行い、薬剤耐性のメカニズムをシステム生物学的解析と組み合わせて解析する研究も行う(黒田)。

以上より、転写産物、蛋白質、ncRNAの網羅的かつ精密な時系列定量解析による発現情報を、システム生物学的解析に供することで、癌の超早期診断、予後予測、分子標的薬の効果予測に有用な新規バイオマーカー、抗がん剤耐性の分子機構、さらに革新的分子標的の発見につながると期待される。

B. 研究方法

1. HERファミリー分子の異常が関わる癌を統合的に理解する研究

——肺癌の新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出

Aトランスクリプトーム解析を軸とする研究(河野、宮野の項にも記述)

本研究は、世界的にも例をみない試みであるので、これから展開する研究の基礎となる実験系を組むための綿密な協議及び詳細な予備実験が必要であった。その中から具体的な方法として、まずは肺癌の新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出を行うこととし、この実験を基礎として、今後様々な癌種へと発展させることとなった。

・第一段階

初代肺上皮由来細胞hSAECをEGF及びイレッサ(Gefitinib)(我々が錠剤より精製)で処理し、詳細な時系列をとり、マイクロアレイ(Agilent)及び網羅的定量的転写産物発現解析装置を用

いた精密時系列データの測定を行う。

測定データは、バイオインフォマティクスによって解析し、癌化パスウェイの構築、数理モデル化及びシミュレーションを行い、正常肺におけるHERファミリーシグナル伝達のゴールドスタンダードとする。

同時にCell Illustratorを用いて、文献情報から、肺におけるHERシグナル伝達のシミュレーションモデルの構築を行う。ウエットデータ取得後は、そのデータを随時Cell Illustratorへ反映させていく。

・ 第二段階

データ取得細胞は以下とする。不死化肺上皮由来細胞に野生型HERあるいはイレッサ感受性変異HERをトランスフェクションした細胞、イレッサ感受性変異HERを発現する肺癌由来細胞株PC9、さらにPC9由来イレッサ耐性亜株を用いる。これらの測定データを、ゴールドスタンダードと比較し、ゲノム同化法を用いて、肺癌におけるHER分子の関わる癌化パスウェイ並びにイレッサ感受性パスウェイさらにイレッサ耐性パスウェイを明らかにする。

B プロテオーム解析及びゲノム解析

平野の項に記述。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

A 乳癌幹細胞の解析

ヒト乳癌において、CD44+CD24-/low分画に属する細胞が癌幹細胞として機能していると最近報告されている。ヒト乳癌細胞株より、CD44+CD24-/low分画の細胞を取り出し、システム生物学的解析のためのモデル系の構築を目指す。まず、細胞株を、癌幹細胞のモデルとして使用可能かどうかの評価を行い、可能であると判断されれば、NOD-SCIDマウスを用いて、個体レベルで癌細胞から進行癌を形成していくモデル系の立ち上げを行う。同時に、癌幹細胞をtumorsphereとして培養することにより、in vitroの解析系の立ち上げも行う。

ヒト乳癌の解析も組み合わせて、新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出を行う。

B 肺癌幹細胞の解析

河野の項に記述。

3. 機能性RNA(ncRNA)の解析

黒田の項に記述。

システム生物学のためのバイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

(倫理面への配慮)

1) 倫理委員会への申請

本研究において肺癌、乳癌の臨床検体を用いることについて、東京医大、国立がんセンター、医科研の倫理委員会への申請の準備を行っている。

2) 動物実験

医科研にて、承認を得ている。

C. 研究成果

1. HERファミリー分子の異常が関わる癌を統合的に理解する研究

——肺癌の新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出

Aトランスクリプトーム解析を軸とする研究(河野、宮野の項にも記述)

基本実験の目標は、非小細胞肺癌において、HER分子の異常な活性化による癌進行パスウェイを統合的に理解することにより、イレッサなどのHERファミリー分子標的薬の効果予測バイオマーカー候補の抽出と、これら薬剤に対する耐性パスウェイの解明から新たな分子標的候補の抽出をめざすこととなった。初代肺胞上皮由来細胞hSAECを用いてHERシグナルのゴールドスタンダードとすること、またデータ取得細胞としては、不死化肺胞上皮由来細胞に野生型HERあるいはイレッサ感受性変異HERをトランスフェクションした細胞、イレッサ感受性変異HERを発現する肺癌由来細胞株PC9、さらにPC9由来イレッサ耐性亜株に決定した。

本年度中に、hSAECを用いたマイクロアレイ解析により、詳細な時系列データが得られた。バイオインフォマティクス解析により、現在3つの異なる手法を用いることにより、肺におけるHERファミリーシグナル伝達とイレッサによる攪乱されるシグナル伝達に関わる遺伝子群の絞り込みを行っている。現在測定されている遺伝子セットが約18,000あるので、そこから1000遺伝子までの絞り込みを目指している。以下の手法を用いている。

バイオインフォマティクスにより、時系列遺伝子発現の定量データを折れ線グラフ化した遺伝子辞書を作製した。これを分子生物学的知識のフル活用により、読み込む手法。

ハブ遺伝子の結合度の差に着目する方式。

システムの動的挙動の差に着目する方式。

②と③は、スーパーコンピューターにより計算を行うバイオインフォマティクスの技術開発を伴うものである。これら3つの手法を組み合わせることにより、よりよい遺伝子セットが得られると考えられる。

の手法を用い、まずEGF刺激後一時間以内に上昇してくるimmediate early geneに着目して解析を行った。その結果、バイオマーカー候補分子としてよいと考えられる遺伝子が多数抽出された。その一部を以下に列挙する。

Mig7, LRIG2,LRIG3, SOCS3, DOK7。

Mig6, LRIG1が癌抑制遺伝子としての機能をもつとする論文が報告されている一方、上記いずれの分子についても癌についての報告はほとんどない。

同時に、Cell Illustratorを用いて、肺におけるHERシグナル伝達系のシミュレーションモデルを構築している。現在は文献情報のみから、約300の論文より、entity (分子及び複合体の数)270までの情報をエンタリーした。

B プロテオーム解析及びゲノム解析

平野の項に記述。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

A 乳癌幹細胞の解析

乳癌細胞株約10種類より、癌幹細胞濃縮CD44+CD24low/-分画をFACSにより選別した結果、3種類の細胞株において、この分画が全体の約7%以下存在し、ヒト乳癌組織における報告と同様の比率で存在することがわかった。レンチウイルスを用いて、これらの細胞にルシフェラーゼレポーターを発現させ、NOD-SCIDマウスの乳腺部皮下へ移植することにより、癌の進行を個体レベルで追跡できるモデル系の立ち上げに成功した。

癌の進行を約2ヶ月追跡した結果、癌幹細胞濃縮分画由来の細胞は、それ以外の細胞より、より早く腫瘍を形成することがわかった。その組織型を調べた結果、癌幹細胞濃縮分画由来の細胞は、それ以外の細胞より、浸潤性が高く、悪性度の高い組織型を示していた。

B 肺癌幹細胞の解析

河野の項に記述。

3. 機能性RNA(ncRNA)の解析

黒田の項に記述。

4. システム生物学のためのバイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

D. 考察

1. HERファミリー分子の異常が関わる癌を統合的に理解する研究

——肺癌の新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出

A トランスクリプトーム解析を軸とする研究(河野、宮野の項にも記述)

バイオインフォマティクス専門家と綿密に協議しながらの基礎データ取得は必須であり、今回計画した基本実験を遂行することにより、従来の方法では得られなかった新たなバイオマーカー候補や分子標的候補の抽出が期待される。同時に、今後の研究を発展させるた

めの重要な方法論的基盤が得られつつある。

今回行ったhSAECを用いた実験の測定値の解析により、マイクロアレイデータの測定値にはばらつきが少なく、遺伝子辞書で確認された既知遺伝子の発現データも、当を得たものであることがわかった。つまり、実験誤差が少ない理想に近い形の実験が行われたと考えられ、ゴールドスタンダードとして最適なものを得ることができた。細胞の選択や条件検討など、予備実験を十分に行った努力が報われたものと考えられる。今後、網羅的qRT-PCRが必要かどうか議論し、必要ないようであれば、データ取得細胞の実験に着手する予定である。

また、遺伝子辞書の読み込みにより、すでにバイオマーカー候補が続々登場していることは、我々のアイデアが正しいことを示しており、心強い限りである。これは、今後実験を進めていくモチベーションの向上につながる。

得られたバイオマーカー候補並びに分子標的候補については、分子生物学実験に立ち戻って機能解析を行うとともに、患者血清並びに手術検体を用いた評価を詳細に行う。論文発表、知的財産取得は随時行っていく。

今後は、HERファミリー分子の活性化が重要な他の癌種として、乳癌、胃癌、大腸がんなどについても解析を進めるとともに、癌の動物モデルを用いた個体レベルの解析へと発展させる予定である。

B プロテオーム解析及びゲノム解析

平野の項に記述。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

A 乳癌幹細胞の解析

癌幹細胞が表現型を変えて増殖浸潤していく、癌の進行過程の統合的理解のための優れた系が立ち上げられたので、今後システム生物学的解析に供する予定である。このような系は、過去に報告がないので、論文発表も随時しながら研究を進めていく。

B 肺癌幹細胞の解析

河野の項に記述。

3. 機能性RNA (ncRNA) の解析

黒田の項に記述。

4. システム生物学的のためのバイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

E. 結論

システム生物学的解析のための基本実験は、第一段階の途中で、解析も着手したばかりであるにも関わらず、既に未報告のバイオマーカー候補分子が複数得られている。このこと

は、我々の手法が有用であることが実証された上に、世界的にもまだ誰も着手していない手法であることから、まだまだ多くのバイオマーカー並びに分子標的を同定できることが期待される。システム生物学が、新規分野として展開し、近未来の医療へと還元されていくことが期待される。

総括：

システム生物学をキーワードに、転写産物、蛋白質、ncRNAの網羅的解析と、バイオインフォマティクスのこれまでにない形態の共同研究は、一年目にして早くも成果が出つつある。これをバネに、より一層研究を推進するとともに、成果の発表、知的財産の獲得を精力的に行っていく。

F. (なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gotoh, N.: Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci.*, in press.
2. Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki T. and Gotoh, N.: FRS2 $\alpha^{2F/2F}$ mutant mice lack the carotid body and exhibit sympathetic ganglia and carotid sinus nerve abnormalities. *Dev. Biol.*, 314, 236-247, 2008.
3. Gotoh, N. and Tsuchida, N.: Membrane-linked docking protein. *Encyclopedia of Cancer*, 2nd Edition, Springer, Heidelberg, Germany, in press.
4. Kang, E.S., Oh, M.A., Lee, S.A., Kim, T.Y., Kim, S.H., Gotoh, N., Kim, Y.N. and Lee, J.W.: EGFR phosphorylation-dependent formation of cell-cell contacts by Ras/Erks cascade inhibition. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1773, 833-843, 2007.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1. 国際出願番号：PCT/JP2008/055468 国際出願日：2008年3月24日

名称：シグナル伝達阻害方法、それに用いるシグナル伝達阻害剤およびその用途

2. 出願番号：特願2007-218126 出願日：2007年8月24日

名称：シグナル伝達調節剤のスクリーニング方法

3. 国際出願番号：PCT/JP2007/056100 国際出願日：2007年3月24日

名称：シグナル伝達阻害方法、それに用いるシグナル伝達阻害剤およびその用途

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究者報告

システム生物学的的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん- 一般-012) に関する研究

分担研究者 河野 隆志 国立がんセンター研究所 生物学部 室長

A. 研究目的

生命現象をシステムとして理解することを目指す「システム生物学」的方法論を駆使して、がんという疾病を統合的に理解することを目指す。その研究成果からは、これまでの方法論では発見されずにおかれた重要な新規バイオマーカー及び革新的分子標的が発見されることが期待されるので、これらを用いて癌の超早期診断及びテーラーメイド医療に資することを目指す。

肺腺がんにおいては、HER1(EGFR)遺伝子の活性化変異が見られるので、同変異が引き起こす細胞内情報伝達異常を把握し、早期診断、予後予測、分子標的薬の効果予測などに有用な新規バイオマーカー・分子標的を同定する。また、肺がんでは、がん幹細胞マーカーが同定されていないため、肺がん幹細胞の同定・分離法を確立し、次に、分離した肺がん幹細胞においてHER分子群により制御される細胞内情報伝達の統合的理解を目指す。研究計画初年度にあたる今年度は、肺がんにおけるバイオマーカー遺伝子同定のための材料の準備を主目標として、研究を進めた。

B. 研究方法

1. 肺がんの新規バイオマーカー・分子標的の同定のための細胞の準備

初代末梢肺上皮由来細胞hSAECにhTERT-cDNAを組み込んだレトロウイルスを感染し、不死化肺上皮由来細胞株hSAEC-hTERT-1を樹立した。次に、正常型、変異型HER-cDNAを組み込んだレトロウイルスを感染し、正常型、変異型HER-cDNAを発現するhSAEC-hTERT-1細胞を樹立した。また、75例のヒト肺がん細胞株よりゲノムDNAを抽出し、direct sequence法を用いてHER1等、HER遺伝子群の変異を同定した。

2. 肺がん幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索

75例のヒト肺がん細胞株より得たpolyA-RNAを抽出、逆転写し、得られたcDNAを鋳型としたreal-time PCR解析によりCD133、CD44、CD87等の表面抗原分子をコードする遺伝子群の発現を調べた。

(倫理面への配慮)

肺がんの臨床検体の遺伝子解析については、国立がんセンター倫理委員会の承認を得てい

る。本研究の実施に当たっては、試料を匿名化することで、試料提供者のプライバシーの保護を行っている。

C. 研究成果

1. 肺がんの新規バイオマーカー・分子標的同定のための細胞の準備

HER分子の異常活性化に伴う発現動態を解析するための材料として用いるがん及び非がん肺上皮細胞の準備を行った。正常なHERシグナルを持つゴールドスタンダードとして、初代末梢肺上皮由来細胞hSAECを用いることとした。また、hSAEC細胞にレトロウイルスベクターを用いてhTERT遺伝子を強制発現することにより、不死化肺上皮細胞株hSAEC-hTERT-1を樹立した。そして、この細胞株に野生型HERあるいはイレッサ感受性変異HER-cDNAを安定導入した細胞、イレッサ感受性変異HERを発現する肺がん由来細胞株PC9、さらにPC9由来イレッサ耐性亜株をHER分子の異常活性化を有する細胞として本研究に用いることとした。

2. 肺がん幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索

75例のヒト肺がん細胞株における表面抗原分子をコードする遺伝子群の発現の検討を開始した。肺がん細胞株の内訳は小細胞がん21例、非小細胞がん54例であった。その結果、肺がん幹細胞マーカーの候補として考えられるCD133遺伝子は小細胞がん(P=0.07、t検定)、CD44、CD87遺伝子は非小細胞がんにより多く発現していることを明らかにした(それぞれ、 $P=3 \times 10^{-6}$ 、 $P=5 \times 10^{-5}$)。

D. 考察

1. 肺がんの新規バイオマーカー・分子標的同定のための細胞の準備

HER分子の異常活性化に伴う発現動態を解析するための材料として用いる肺がん及び非がん肺上皮細胞が準備された。今後、これらの細胞を用いることで、HER変異に伴う細胞内情報伝達異常の把握し、バイオマーカー、分子標的の探索を行うことが可能となる。

2. 肺がん幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索

幹細胞マーカー候補遺伝子群の発現には、組織型による特異性が見られた。この結果は、肺がんの組織型により幹細胞マーカーが異なること、つまり、異なる細胞ががん幹細胞であることを示している。よって、肺がんでは組織型により治療標的となる細胞の性質が異なる可能性がある。今後、マーカー遺伝子群の発現強度により肺がん細胞を分画し、ヌードマウスにおける腫瘍原性等を調べることにより、肺がん幹細胞を同定して行く予定である。

E. 結論

肺がんにおけるバイオマーカー・分子標的遺伝子同定のための材料の準備が整った。また、肺がん幹細胞の同定・分離に関する研究に着手した。

F. (なし)

G. 研究発表

3. 論文発表

Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Yamamoto S, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. Clin. Cancer Res., 13(1):111-120, 2007.

Takahashi K, Kohno T, Matsumoto S, Nakanishi Y, Arai Y, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. Lung Cancer 57(1):103-108, 2007.

Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, Suzuki K, Nakamoto M, Shimizu E, Minna JD, Yokota J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. Oncogene 26(40):5911-5918. 2007

Nagayama K, Kohno T, Sato M, Arai Y, Minna JD, Yokota J. Homozygous deletion scanning of the lung cancer genome at a 100-kb resolution. Genes Chromosomes Cancer 46(11):1000-1010, 2007.

Iwakawa R, Kohno T, Anami Y, Suzuki K, Matsuno Y, Noguchi M, Mishima K, Nishikawa R, Tashiro F, and Yokota J. Association of p16 homozygous deletions with clinicopathological characteristics and EGFR/KRAS/p53 mutations in lung adenocarcinoma. Clin. Cancer Res, 2008, in press.

4. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他
該当なし

システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん- 一般-012) に関する研究

分担研究者 黒田 雅彦 東京医科大学 病理学部 准教授

A. 研究目的

Frs2betaの発現をヒト組織を用いて検討する。

B. 研究方法

乳癌組織において、抗Frs2betaモノクローナル抗体を用い免疫組織化学的にFrs2betaの発現を検討した。さらにEGFfamilyの他の分子の発現との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

厚生中央病院倫理委員会の指針にもとずいて検討を行った。

C. 研究成果

乳癌切片において、癌組織特異的にFRS2 β の染色像が得られた。また、一部の乳癌においては、細胞の核にもFRS2 β の陽性像が確認された。核内のFRS2 β 陽性所見は、正常細胞にはみられないことから、癌特異的な変化と考えられた。一部の症例において、ErbB2の発現が強い症例では、FRS2 β の染色性の低下がみられた。

D. 考察

ErbB2とFRS2 β の染色によって、FRS2 β がErbB2のシグナル伝達を負に制御している可能性が示された。

E. 結論

今後EGFRの治療薬の開発が行われた場合、FRS2 β の発現の評価は重要になると考えられる。その際本モノクローナル抗体は、重要な診断マーカーになる可能性がある。

F. (なし)

G. 研究発表

5. 論文発表

1. Zhang J, Hakansson H, Kuroda M, Yuan L. Wapl localization on the synaptonemal complex. A meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes. *Reprod Domest*

Anim., 43:124-6, 2008.

2. Naoe Y, Setoguchi R, Akiyama K, Muroi S, Kuroda M, Hatam F, Littman DR, Taniuchi I: Repression of interleukin (IL)-4 in T helper type 1 (Th1) cells by Runx complex through binding to IL-4 silencer. *J Exp. Med.*, 204:1749-1755, 2007.
3. Ohyashiki K, Tauchi T, Kuroda M, Kodama A, Ohyashiki JH: Recurrent chromosomal aberration at 12q15 in chronic idiopathic myelofibrosis with or without JAK2^{V617F} mutation, *Leukemia*, 21:1578-80, 2007
4. Ohbayashi T, Oikawa, K, Yamada K, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Satoh H, Mukai H, Mukai K, Kuroda M: Unscheduled overexpression of human WAPL promotes chromosomal instability. *Biochem Biophys Res Commun* , 356:699-704, 2007.
5. Iwaya, K, Oikawa, K, Semba, S, Tsuchiya, B, Mukai Y, Otsubo T, Nagao T, Izumi K, Kuroda, M, Domoto H, Mukai K: Correlation with liver metastasis of the colocalization of Arp2/3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 98:992-999,2007.

6. 学会発表

1. 田中正視、及川恒輔、小杉好紀、黒田雅彦 月経血におけるヒトパピローマウイルス (HPV) の検出方法 第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、横浜、2007年12月11日～15日
2. 及川恒輔、田中正視、秋好歩美、高梨正勝、黒田雅彦 TLS-CHOP 特異的 siRNA による粘液型脂肪肉腫の細胞増殖抑制機構 第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、横浜、2007年12月11日～15日
3. 鈴木理恵子、及川恒輔、高梨正勝、工藤玄恵、黒田雅彦 PRG4 の各 splicing variant の細胞増殖と分化における機能の解析 第30回日本分子生物学会年会 (BMB2007)、横浜、2007年12月11日～15日
4. Matsubayashi J, Takanashi M, Oikawa K, Mingli Xu, Mukai K, Kuroda M Expression of G-protein-coupled receptor kinase 4 is associated with breast cancer tumorigenesis. *Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, San Francisco, USA Oct.22-26 2007
5. Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M Dioxin interferes in chromosomal positioning through the aryl hydrocarbon receptor, 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月3日～5日
6. Matsubayashi J, Takanashi M, Oikawa K, Kuroda M, Mukai K Expression of G-protein-coupled receptor kinase 4 is associated with breast cancer tumorigenesis, 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月3日～5日
7. 黒田雅彦、及川恒輔、高梨正勝、山本謙吾、向井清 粘液型脂肪肉腫の診断と治療への応用 第40回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、山梨、2007年7月12,13日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

①関節炎治療及び予防剤、特願2007-233094

②癌のマーカ-、検査方法および検査用キット、特願2008-83897号

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん- 一般-012) に関する研究

分担研究者 宮野 悟 東京大学医科学研究所 DNA情報解析分野 教授

A. 研究目的

システム生物学的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索のための、バイオインフォマティクス技術を開発することを目的とする。

B. 研究方法

癌関連パスウェイの数理モデル化とシミュレーションによるシステム解析をシステム生物学のためのモデル構築シミュレーションソフトウェアCell Illustratorを用いて行う。また、本研究で取得するEGF及びイレッサ処理した細胞のマイクロアレイによる時系列遺伝子発現解析データから1000個オーダーの遺伝子を選別し、それらの遺伝子群に対して、状態空間モデルや自己回帰モデルにより遺伝子制御ネットワークをヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータで計算する。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

Cell System Ontology情報が付加されたEGFRパスウェイのシミュレーションモデルをCell Illustratorを用いて構築し、予備的なシミュレーション実験を行い、このパスウェイの動的な挙動に関する知見を得た。さらに、前述のEGF刺激及びイレッサ処理後の時系列遺伝子発現データに対して、ネットワークを計算し、ハブ遺伝子の結合度の差に着目した方式及びシステムの動的挙動の差に着目した方式を新たに開発し、数万の遺伝子の中から、バイオマーカー及び分子標的の候補を数百までに絞り込むことを可能にするバイオインフォマティクス技術を構築した。

D. 考察

本研究では、時点数として19ポイント、繰り返し計測回数2で遺伝子発現データがとられているが、さらに細かく時点を取り、繰り返し計測もさらに多くすれば、推定方式と数理モデルの理論的考察及び数値実験により、さらに精緻なシミュレーションモデルの構築ならびにシステム動態の解明が可能であることが示唆された。

E. 結論

本研究で開発したバイオインフォマティクス技術が、バイオマーカー及び分子標的探索に有効であることが強く期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirose, O., Yoshida, R., Imoto, S., Yamaguchi, R., Higuchi, T., Charnock-Jones, D.S., Print, C., Miyano, S. Statistical inference of transcriptional module-based gene networks from time course gene expression profiles by using state space models. *Bioinformatics*. 24(7): 932-942, 2008.
2. Hirose, O., Yoshida, R., Yamaguchi, R., Imoto, S., Higuchi, T., Miyano, S. Clustering with time course gene expression profiles and the mixture of state space models. *Genome Informatics*. 18:258-266, 2007.
3. Jeong, E., Nagasaki, M., Saito, A., Miyano, S. Cell System Ontology: Representation for modeling, visualizing, and simulating biological pathways. *In Silico Biology* 7, 0055 (2007)
4. Shimamura, T., Yamaguchi, R., Imoto, S., Miyano, S. Weighted lasso in graphical Gaussian modeling for large gene network estimation based on microarray data. *Genome Informatics*. 19, 142-153, 2007.

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

システム生物学的的方法論による癌のバイオマーカー及び分子標的の探索
(H19-3次がん- 一般-012) に関する研究

分担研究者 平野 隆 東京医科大学 呼吸器外科 准教授

A. 研究目的

- ① チロシンキナーゼインヒビターは東洋人の非喫煙女性の腺癌に有効とされ、日本人ではこのグループにEGFRの変異が高頻度に認められている。中国における肺癌での状況との比較解析を行う。
- ② チロシンキナーゼインヒビターが影響を与えるリン酸化経路と治療効果との関連を明らかにする。
- ③ 近年増加傾向にある非喫煙者の肺腺癌の発癌過程を明らかにする。

研究方法

- ① 中国人肺癌切除症例（ホルマリン固定標本）からDNAを抽出し、EGFRの遺伝子変異解析(exon 18, 19, 21)を行った。
- ② exon 19のdeletion株である肺腺癌にEGF刺激とgefitinib処理を施し、リン酸化蛋白質の変化を2次元電気泳動法（ETTAN-DIGE法）により検出する。
- ③ 喫煙女性の腺癌症例と非喫煙女性の腺癌症例、またそれぞれの男性症例からDNAを抽出、MACアレイにて遺伝子異常のパターンを測定し、各群間の発癌に関与している遺伝子異常の違いを検討する。

(倫理面への配慮)

基本的に（中国人の臨床検体を含め）文書によるインフォームドコンセントが得られた症例を解析対象とした。

C. 研究成果

- ① 腺癌69症例中31例（44.9%）；非腺癌83例中6例(7.2%)にEGFRの遺伝子変異を認め、同じ方法で解析した自験例（日本人）での結果は腺癌48.9%、非腺癌3.7%であった。
- ② PC9はEGF刺激で発現蛋白質に大きな変化は認めなかった。
Gefitinib作用により発現量が2倍以上多くなるspotおよび2分の1以下に減少したspotをそれぞれ22、11個を検出した。
- ③ 喫煙者と非喫煙者の肺腺癌にみられる遺伝子変化：4現在までの解析では、喫煙者の肺腺癌にみられる欠失は、染色体7、9、11及び18に存在し、特に18にいくつかの変化が認められた。増幅は、染色体3、5、15、18および20に認められた。