

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 後藤 典子

平成21(2009)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

後藤 典子

1

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

河野 隆志

13

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

黒田 雅彦

17

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

宮野 悟

21

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

平野 隆

25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

33

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研究ユニット 准教授

研究要旨

本研究では、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的としている。正常肺腺細胞を用いた HER シグナル伝達遺伝子制御ゴールドスタンダードモデルを構築し、シミュレーションを行うことにより、早期肺癌の予後を予測する画期的遺伝子シグネチャーを得ることに成功した。さらに、乳癌幹細胞の解析より、乳癌幹細胞を特徴づけるバイオマーカー並びに分子標的候補遺伝子セットを得ることに成功した。また、プロテオミクス並びにゲノム解析や、ncRNA の解析より、癌の新規バイオマーカー並びに分子標的候補が同定された。今後臨床検体を用いた評価及び実用化へと進める予定である。

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定されており、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である。さらに、肺癌は、世界的にも最も癌死の多い疾患であり、特に手術可能な早期癌でも再発して死に至ることが問題となっている。そのため、早期癌の予後を予測する診断法の確立が課題になっていることから、世界的にも本研究を推進する必要性がある。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。加えて、河野は、候補分子の評価およびその生物学的、病理学的意義の理解のための解析試料として、肺腺がん手術症例の収集を行う。

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バス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。粘液型脂肪肉腫は、比較的発生頻度の高い肉腫であるが、その腫瘍発生において脂肪分化の異常がこれまでの我々の研究から明らかになっている。一方脂肪分化において、重要な役割をはたしているのが PPAR γ という転写因子である。そこで我々は、新規の治療標的の単離のため、システムバイオロジーの手法の手法を用いて PPAR γ の標的となっている miRNA の同定を行った(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

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)

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。ウェ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。

次に、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

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。

4. システム生物学のためのバイオインフォマティクスの開発

宮野の項に記述。

(倫理面への配慮)

1) 倫理委員会

肺がん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審査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。乳癌臨床検体の解析について、東京大学病院倫理委員会への申請準備中である。

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)

非小細胞肺癌ステージIの予後を精度よく予測するシグネチャーを得ることに成功した。

(特許出願：2008年12月5日 特願 2008-311481)

H19年度に取得した正常ヒト肺上皮細胞 (Small airway epithelial cells, SAEC) での時系列マイクロアレイデータの更なる解析を行なった。

具体的には、H20年度上半期に新たに報告された複数の文献報告及び大規模 microarray 情報の公開に伴い、新たな仮説に基づき SAEC を用いた時系列マイクロアレイデータを用いて stage I 及び all stage において効果的に予後予測可能な gene set の抽出を行ない、最終的に 139 遺伝子 (stage I)、148 遺伝子 (all stage) の遺伝子セットを同定した。

予後予測遺伝子セット抽出の為の仮説及び方法と結果は以下の通りである。肺癌における初期ステージ患者は外科切除ののち約半数が再発する。化学療法を選択は副作用と効果の期待が再発率に対応する為に大きなジレンマであり、治療法選択の為のバイオマーカーが必要とされている。臨床サンプルを用いた microarray 解析は多数報告されているが、限定的なサンプルによっ

て選択されたマーカーが実質的には患者に適応出来ないレベルであるのが現状である。H20年度上半期に報告された Shedden らの論文 (Nature Medicine 2008 vol.14 p822) では、多施設の肺線癌患者 442 例もの Microarray データを用いて様々な解析方法により上記の問題を解決するマーカーセットの抽出を試みたが stage I の予後予測をすることは難しいと報告した。同時期に Ben-Porath ら (Nature Genetics 2008 vol.40 p499) と Wong ら (Cell Stem Cell 2008 vol.2 p33) によって Embryonic stem cell の遺伝子 signature がいくつかの悪性癌にもみられる事が報告された。また、188 例の肺線癌患者の大規模シークエンスにより EGFR を含む MAPK 経路の somatic mutation が肺癌に重要な役割を果たしている事も報告された (Nature 2008 vol.455 p1069)。これら H20年度上半期の新規報告を受けて、SAEC を用いて得られた microarray データを利用する事で肺癌の予後予測マーカーの抽出を試みた。

仮説は以下の通りである。

1) 癌の多様性を克服するために肺腺癌の起源である SAEC は利用可能ではないか？ また、肺腺癌において重要な経路は EGFR を含む MAPK 経路であることから、SAEC を EGF で刺激することでそれらの経路を包括的に活性化出来ているのではないか？

2) システムレベルでの制御を考慮した遺伝子抽出方法によって効果的に候補遺伝子の絞り込みが出来るのではないか？

上記2つの仮説を検証する解析として、SAEC の時系列 microarray の結果から EGF 刺激によって動きのある遺伝子を抽出した。DNA Microarray では 19267 遺伝子の発現情報を得る事が出来るが、primary selection として 1500 遺伝子まで抽出を行なった。選択方法は以下の通りである。: Flag 情報を元に EGF 及び EGF+gefitinib 群で計 26 以上の P-Flag を持つ遺伝子 10282 遺伝子を選び出した。次に既知の EGF 関連遺伝子、及び EGF によって動きのあった遺伝子 589 遺伝子をこの中から選択した。更に得られた 589 遺伝子を Ingenuity pathway analysis database を用いて、それらの関連因子 597 遺伝子を追加した。最後に EGF 刺激による変動係数の大きい 314 遺伝子を追加し、計 1500 遺伝子を EGF 関連遺伝子として選択した。上記手順によって選ばれた 1500 遺伝子を用いて正常肺細胞への EGF 刺激により肺線癌で促進されている遺伝子群を抽出できるのか、という仮説を検証する為に Shedden らによって公開されている 442 症例の microarray データを用いて stage I 及び all stage の予後予測を行なった。結果、all stage では $P < 0.05$ という良い予測結果を得る事が出来、仮説の正しさを確認した。ただし、難しいとされる stage I の予測は P 値が 0.05 を若干超える結果であった。

正常細胞を EGF で刺激することで動きのある遺伝子が肺腺癌における遺伝子の動態を包括的に模倣できるという仮説は確かめられたが、stage I の予

後予測の質についてはまだ改良の余地があると考えられた。そこで、1500 遺伝子から更に遺伝子を選択する事で予測精度を改良する事を試みた。従来法として良く用いられる fold change による絞り込みでは 6 時間及び 12 時間時点での差が 2 倍、或いは 4 倍で選択を行なっても stage I 及び all stage のどちらも予測精度の改善はみられなかった。そこで、表面的な遺伝子発現の動きの大きさのみを指標にするのではなく、システムレベルで全体の制御関係を計算することにより予後予測の精度を上げる様な遺伝子抽出が出来ないかを検証した。方法としては、状態空間モデル (State space model; SSM) を用いることで 1500 遺伝子の動的なネットワーク制御モデルを EGF 刺激データにより作製し、Partial cox hazard モデルにより臨床データ情報の学習から更なる遺伝子選択を行なうという 2 段階の処理を行なった。EGF 関連遺伝子 1500 のデータから SSM を用いることで 8 つの module へ集約することで 8×8 の 64 行列の制御関係を計算し、ここに EGF+gefitinib のデータを重ねる事で EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤により高感受性の、特に EGF 刺激の影響の大きな 278 遺伝子を選択した。その後、これら 278 遺伝子を partial cox hazard モデルにより予後に寄与する重みの大きな遺伝子を計算によって選り出し、139 遺伝子に絞り込んだ結果 stage I の予後を効果的に予測する事に成功した。同様の手順を用いて感受性の高さをより強い遺伝子群に設定する事で all stage の予後も効果的に予測可能な 148 の遺伝子セットの抽出にも成功した。

B) プロテオーム解析

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

細胞株 10 種類のヒト乳癌細胞株 (AU-565, BT-474, HCC70, HCC1419, HCC1954, HMC-/-, MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3, T47-D) における CD24, CD44 の発現パターンをフローサイトメーターにて解析し、癌幹細胞 (tumor initiating cells: TIC) が多く存在するとして知られる CD24^{-low} CD44⁺画分をもつ細胞株 HCC70, HCC1954, MCF-7 を選別した。この 3 種の細胞株について、癌幹細胞画分である CD24^{-low} CD44⁺画分と、対照群として CD24⁺CD44⁺画分を、それぞれ 10% ずつフローサイトメーターを用いてソーティングし、この 3 種の細胞株の両画分の遺伝子発現パターンについてマイクロアレイを行うとともに、その結果を GSEA (Gene set enrichment analysis) によって解析した。またその解析結果より、CD24^{-low} CD44⁺画分で高い発現がみられると考えられる遺伝子について、乳癌細胞

株 HCC1954 を用いて qRT-PCR によって定量的に確認を行った。

マイクロアレイデータを GSEA によって解析した結果、CD24^{low} CD44⁺ 画分は、TGF-beta pathways, oncogenic Ras pathways, TNF response ならびに IFNs response に関する遺伝子セットとの高い相関性がみられた。また対照群である CD24⁺CD44⁺画分では、有意に相関があると考えられる遺伝子セットのうち、約 20% に cell cycle 関連の遺伝子セットがみられることがわかった。また、GSEA の解析結果より、CD24^{low} CD44⁺画分で高い発現がみられると考えられる遺伝子について qRT-PCR を行ったところ、Vascular endothelial growth factor A(VEGFA)、Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)、Interleukin 8 (IL8)、stromal cell-derived factor 2-like 1 (SDF2L) ならびに toll-like receptor 1 (TLR1) において CD24^{low} CD44⁺画分で有意に発現が高く、コントロールとして CD24 の mRNA は CD24⁺CD44⁺画分において有意に高いことが確認された。

以上の解析から、乳癌幹細胞を特徴づける癌バイオマーカー並びに分子標的として 150 分子を得、特許出願を行った。

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)

今回正常肺腺細胞を用いた HER シグナル伝達遺伝子制御ゴールドスタンダードモデルを構築し、シミュレーションを行うことにより、早期肺癌の予後を予測する画期的遺伝子シグネチャーを得ることに成功した。これまで、肺癌組織検体のマイクロアレイ解析より、早期肺癌の予後予測シグネチャー抽出の試みは、世界的にたくさんの研究が行われてきた。しかし、現状では、臨床レベルで使用可能な精度の良い予後予測シグネチャーは得られていなかった。今回、システム生物学的手法により、正常細胞内の増殖因子によるシグナル伝達を統合的に解析するという、これまで考えつかれなかった全く

新しい発想による解析の結果、精度高い予後予測シグネチャーが得られた。この結果は、システム生物学が、実際に臨床上有用な癌のバイオマーカー並びに分子標的の探索に有用であることが示された、世界的にも最初の結果であると考えられる。

今後さらに、システム生物学的手法により、新たな癌のバイオマーカー並びに分子標的候補の抽出へと、本研究を進めて行く予定である。また同時に、肺癌の臨床検体もかなりの数が集められてきたので、実際の癌組織検体を用いた個々の分子の評価を行っていく。そして、肺癌予後予測シグネチャーに関しては、実用化へと進めていく。

B) プロテオーム解析

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

乳癌細胞株においても、 $CD24^{-/low} CD44^{+}$ 画分は癌幹細胞と類似の性質を保持していることが示唆され、これらの乳癌細胞株は、乳癌幹細胞に関するバイオマーカーの同定、新たな分子標的の発見に応用可能であることが考えられた。また GSEA によって、 $CD24^{-/low} CD44^{+}$ 画分では、これまで癌幹細胞画分における発現、活性や EMT ならびにそれに伴う悪性化との関連が報告されている TGF-beta pathways や oncogenic Ras pathways だけでなく、新たに TNF response ならびに IFNs response との関連性も示唆された。

今後、得られた癌幹細胞バイオマーカー並びに分子標的候補の評価を臨床検体を用いて行っていく予定である。

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による正常肺腺細胞の HER シグナルゴールドスタンダードモデルの構築を行った結果、早期肺癌の画期的予後

予測シグネチャーを得ることができた。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、画期的成果が出た。これをパネに、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、さらに実用化へと精力的に進めていく。

F. (なし)

G. 研究発表

1.論文発表

Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki, T. and Gotoh, N.: FRS2alpha is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus. *Dev. Dyn.*, 238, 503-513, 2009.

Yamauchi, M., and Gotoh, N.: Molecular mechanisms determining efficacy of EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitors help to identify biomarker candidates. *Biomarkers in Medicine*, 3, 139-151, 2009.

Minegishi, Y., and Gotoh, N.: Frs2beta. *UCSD-Nature Molecule Pages* doi:10.1038/mp.a004122.01, 2009, in press.

Minegishi, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Horii, T., Hoshino, T., Kodama, T., Hamakubo, T. and Gotoh, N.: Prominent expression of FRS2 β protein in neural cells and its association with intracellular vesicles. *FEBS lett.*, 583, 807-814, 2009.

Sato T. and Gotoh, N.: The FRS2 family of docking/scaffold adaptor proteins as therapeutic targets of cancer treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, in press.

Sato, T. and Gotoh, N.: Frs2alpha. *UCSD-Nature Molecule Pages*,

doi:10.1038/mp.a000967.01, 2009, in press.

Gotoh, N.: Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 4, 9-15, 2009.

Gotoh, N.: Feedback inhibitors of epidermal growth factor receptor signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 511-515, 2009.

Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Hatanaka, Y., Ueno, K., Higuchi, T., Gotoh, N. and Miyano, S.: Predicting differences in gene regulatory systems by state space models. *Genome Informatics*, 21, 101-113, 2008.

Gotoh, N.: Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci.*, 99, p1319, 2008.

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.

Gotoh, N. and Tsuchida, N.: Membrane-linked docking protein. *Encyclopedia of Cancer, 2nd Edition, Springer, Heidelberg, Germany*, July 4, 2008.

2.学会発表

Mai Yamauchi, Takashi Kohno, Jun Yokota, Noriko Gotoh.

Identification of new biomarkers and molecular targets of lung cancers by systems biology approach.

第 67 回 日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 2008 年 10 月

山内麻衣、山口類、長崎正朗、島村徹平、井元清哉、斉藤あゆむ、植野和子、畑中洋亮、吉田亮、樋口知之、河野隆志、横田淳、宮野悟、後藤典子
システム生物学的アプローチによる新規肺癌マーカーと分子標的の探索と解析

Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2008 神戸ポートアイランド
2008 年 12 月

後藤典子、山内麻衣、山口類、長崎正朗、島村徹平、井元清哉、斉藤あゆむ、

植野和子、畑中洋亮、吉田亮、樋口知之、河野隆志、横田淳、宮野悟
システム生物学的方法論による肺癌の新規バイオマーカー及び分子標的の
探索

Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2008 神戸ポートアイランド
2008年12月

井元清哉、山口類、島村徹平、玉田嘉紀、長崎正朗、斉藤あゆむ、植野和子、
畑中洋亮、吉田亮、樋口知之、山内麻衣、後藤典子、宮野悟
バイオマーカー・分子標的探索のための動的ネットワークを予測する計算科
学的方法の開発

Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2008 神戸ポートアイランド
2008年12月

Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Mai Yamauchi, Masao Nagasaki, Ryo Yoshida,
Teppei Shimamura, Yosuke Hatanaka, Kazuko Ueno, Tomoyuki Higuchi, Noriko
Gotoh, Satoru Miyano.

Predicting differences in gene regulatory systems by state space models

The 19th International Conference on Genome Informatics (GIW2008)

Australia 2008年12月

Mariko Hatakeyama¹, Takeshi Nagashima¹, Kazuhiro Ikeda², Yoko Kuroki¹,
Noriko Gotoh³, Masaaki Oyama³, Satoshi Inoue², Hiroaki Hirano⁴

IRIKEN Advanced Science Institute, ²Research Center for Genomic Medicine,
Saitama Medical University, ³Institute of Medical Science, University of Tokyo,
⁴The Systems Biology Institute

title: Difference and commonality of gene regulatory networks in
ligand-stimulated wild type and drug-resistant MCF-7 breast cancer cells

The 9th International Conference on Systems Biology

2008年8月23~27日

Göteborg convention centre, Göteborg, Sweden

ポスター

Shinya Tasaki¹, Masaaki Oyama¹, Masao Nagasaki¹, Hiroko Kozuka-Hata¹,
Kentaro Semba², Noriko Gotoh¹, Seisuke Hattori³, Jun-ichiro Inoue¹, Tadashi
Yamamoto¹, Satoru Miyano¹, Sumio Sugano¹

¹Institute of Medical Science, University of Tokyo, ²Waseda University,
³Kitasato University

Title: System-level analysis of EGFR signal transduction based on quantitative

temporal data of protein tyrosine phosphorylation
The 9th International Conference on Systems Biology
2008年8月23～27日
Gothenburg convention centre, Gothenburg, Sweden
ポスター

Masahiko Kurodal, Noriko Gotoh

1Tokyo Medical University

Title: FRS2beta adaptor is a novel tumor suppressor for breast cancer by attenuating ErbB signaling.

American Association for Cancer Research

2008年4月12日～16日

San Diego Convention Center, USA

ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許出願

2009年2月4日 特願 2009-023933

発明者：後藤典子、室橋道子、油谷浩幸、砂河孝行、黒田雅彦

名称：固形癌の再発予測のための試験方法及び再発予防剤

2008年12月5日 特願 2008-311481

発明者：後藤典子、山内麻衣、宮野悟、井元清哉、山口類、横田淳、河野隆志

名称：癌の予後を予測するためのバイオマーカー

国際特許出願：2008年3月24日 PCT/JP2008/055468

発明者：後藤典子、黒田雅彦

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

なし

3.その他

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策
(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。今年度は、後藤らの不死化肺上皮由来細胞の EGF 刺激時系列データを用いたシステム生物学的解析によって同定された肺がん予後予測遺伝子群の validation およびその生物学的、病理学的意義の理解のための解析試料として、肺腺がん手術症例の DNA, RNA を調整した。そして、個々の検体の基盤情報として EGFR 及び KRAS 遺伝子の変異解析を行った。また、FACS 解析により、肺がん細胞株における CD133、CD24、CD44 等の表面抗原分子を発現状態の解析を開始した。

B. 研究方法

1. 肺腺がん手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

本研究への肺がんの臨床検体の遺伝子解析に関し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を取得した。2000-2008 年の期間における国立がんセンター中央病院手術摘出標本より、肺腺がん 588 例を同定した。液体窒素凍結標本の半量より、ゲノム DNA を抽出し、direct sequence 法、および、HRMA(High-resolution melting analysis)法を用いて EGFR 遺伝子変異を検索した。また、30 例の検体より、Total RNA を抽出した。

2. 肺がん細胞株における CD133、CD24、CD44 表面抗原分子の発現解析

13 例の肺がん細胞株（腺がん：A549, HCC78, HCC193, H358, H2087, 大細胞がん：H1299, PC13, H460, 小細胞由来：Lu135, H1607, H2195, 扁平上皮が

ん：LK2, H520) における CD133, CD24, CD44 分子の発現状態を解析した。マウス抗 CD133 抗体-PE conjugated(Milteny)、マウス抗 uPAR(CD87)抗-FITC conjugated (American Diagnostica)、マウス抗 CD44 抗体-FITC conjugated (BD bioscience)、マウス抗 CD24 抗体-PE conjugated (BD bioscience) 及びアイソタイプコントロールとしてそれぞれマウス IgG -PE conjugated, マウス IgG-FITC conjugated (BD bioscience) を用いて細胞を染色後、FACS 解析により陽性細胞率を算出した。

(倫理面への配慮)

肺がん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審査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. 肺腺がん手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

肺腺がん 588 例のうち、EGFR 変異陽性症例は 287 例(49%)であった。その内訳は exon 19_欠失型変異が 128 例(22%)、exon 21_L858R 変異が 159 例(27%)であった。また、一部 KRAS 遺伝子の変異の検索を開始し、現時点で 150 例中 12 例(8%)に変異を同定している。予後に関しては、現時点で全生存期間、無再発生存期間について 105 例の情報を得ている。

2. 肺がん幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索

昨年度の定量的 RT-PCR 解析において、CD133、CD44、CD24 表面抗原遺伝子群の発現が肺がん細胞株で検出された。そこで、13 例の肺がん細胞株(腺がん：A549, HCC78, HCC193, H358, H2087, 大細胞がん：H1299, PC13, H460, 小細胞由来：Lu135, H1607, H2195, 扁平上皮がん：LK2, H520)における同分子陽性細胞率を FACS 法により算出した。その結果、脳腫瘍等のがん幹細胞マーカーとされる CD133 に関しては、12 株で 1-10%の細胞が陽性を示し、残り 1 株は 50%の発現を示した。一方、乳がんにおけるがん幹細胞とされる CD44^{high}/CD24^{low} 画分は、細胞株間で 1%以下-96%と大きく異なっていた。CD133、CD44、CD24、CD87 分子の発現と肺がん組織型・遺伝子異常との関連はみられなかった。

D. 考察

1. 肺腺がん手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

肺腺がん 588 例における EGFR 変異率は約 50%であり、この頻度は過去の報告と比べると若干高い。これは、全 DNA 中変異がアレル 1%以上存在すれば検出されるという HRMA 法の高い検出感度によると考えられる。今後

は、これらの検体より RNA を抽出し、同定された肺がん予後予測遺伝子群の発現と予後との関連の validation を行う予定である。また、肺がん予後予測遺伝子群の発現 profile と遺伝子変異、診療情報との関連を明らかにすることで、発現 profile の生物学的、病理学的意義の理解を目指したい。

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分子の発現が FACS 法で確認された。特に、CD133 分子の発現については約 1% の細胞が陽性を示し、この結果は、脳腫瘍や肺がんにおけるがん幹細胞の研究結果と一致している。一方、CD44^{high}/CD24^{low} 細胞に関しては、各細胞株間でその fraction 率に大きな差があった。これは、乳がん幹細胞の研究結果と一致している。よって、現時点では、CD133+細胞および、CD44^{high}/CD24^{low} 細胞には、がん幹細胞が濃縮されている可能性がある。今後、これらの細胞のヌードマウスにおける腫瘍原性等を調べることにより、がん幹細胞特性との関連を明らかにする予定である。

E. 結論

肺がん予後予測遺伝子群の validation およびその生物学的、病理学的意義の理解のための肺腺がん手術症例の準備が整い、それらには EGFR 変異がんが 50% 含まれることを確認した。CD133、CD44、CD24 分子を、肺がん細胞におけるがん幹細胞マーカーの候補として、さらなる追及を行うことに決定した。

F. (なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakanishi H, Matsumoto S, Iwakawa R, Kohno T, Suzuki K, Tsuta K, Matsuno Y, Noguchi M, Shimizu E, Yokota J. Whole Genome Comparison of Allelic Imbalance between Noninvasive and Invasive Small-Sized Lung Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 69: 1615-1623, 2009.
2. Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Watanabe S, Goto K, Nishiwaki Y, Shimada Y, Hirose H, Saito I, Kuchiba A, Yamamoto S, Yokota J. Contribution of Nicotine Acetylcholine Receptor Polymorphisms to Lung Cancer Risk in a Smoking -independent Manner in the Japanese. *Carcinogenesis.* 2009 30(1): 65-70.
1. 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.* 14(12):3746-3753, 2008.
2. Ogiwara H, Kohno T, Nakanishi H, Nagayama K, Sato M, Yokota J. Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in human lung cancer. *Oncogene.* 27:4788-4797, 2008.
 3. Kohno T, Kunitoh H, Suzuki K, Yamamoto S, Kuchiba A, Matsuno Y, Yanagitani N, Yokota J. Association of KRAS polymorphisms with risk for lung adenocarcinoma accompanied by atypical adenomatous hyperplasias. *Carcinogenesis.* 29:957-963, 2008.

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. 特許出願：2008年12月5日 特願2008-311481

発明者：後藤典子、山内麻衣、宮野悟、井元清哉、山口類、横田淳、
河野隆志

名称：癌の予後を予測するためのバイオマーカー

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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策
(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

粘液型脂肪肉腫は、比較的発生頻度の高い肉腫であるが、その腫瘍発生において脂肪分化の異常がこれまでの我々の研究から明らかになっている。一方脂肪分化において、重要な役割をはたしているのが PPAR α という転写因子である。そこで我々は、新規の治療標的の単離のため、システムバイオロジーの手法の手法を用いて PPAR α の標的となっている miRNA の同定を行った。

B. 研究方法

脂肪細胞に分化誘導可能な 3T3-L1 細胞を用いマイクロアレイ法を用いて、0d,1d,5d,7d において mRNA の発現と miRNA の発現の相関を解析した。さらに、システムバイオロジーの手法の手法を用いて PPAR α の標的となる miRNA を単離した。

(倫理面への配慮)

マウス細胞を用いた検討のため倫理面の配慮は行っていない。

C. 研究成果

Pearson's correlation によって、PPAR α と発現が経時的に相関する 5 つの miRNA を同定した。さらに、これらの miRNA は PPAR γ によって転写制御を受けている可能性が高く、その検証として各 miRNA の上流 20kbp に PPARE(AGGTCA-N-AGGTCA)がないか配列検索を行った。その結果 4 つの miRNA の上流域に AGGTCA-N-AGGTCA 配列を確認した。さらに、これらの 4 つの miRNA の標的となっている 40 の遺伝子の同定を行った。

D. 考察

システムバイオロジーの手法の手法ももちいることで、PPAR α の発現ネットワークを同定することが可能となった。

E. 結論

今後この PPAR α のネットワークを解析することで、新規の脂肪肉腫の分化誘導療法の標的となる分子が同定される可能性がある。

F. (なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi A, Takeuchi M, Oikawa K, Sonoda K, Usui M, Okunuki Y, Takeda A, Yuji Oshima Y, Yoshida Y, Usui M, Goto H, Kuroda M. Dioxin promotes vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the retina and enhances choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. in press*
2. Takanashi M, Oikawa K, Sudo K, Tanaka M, Fujita K, Kasper R, Matsuzaki M, Kuroda M. Therapeutic silencing of an endogenous gene by the siRNA cream in an arthritis model mouse. *Gene Therapy, in press.*
3. Takanashi M, Oikawa K, Fujita K, Kudo M, Kinoshita M, Kuroda M. HP1 α epigenetically regulates cell differentiation and exhibits potential as a therapeutic target for various types of cancers. *Am J Pathol, 174: 309-316, 2009.*
4. Matsubayashi J, Takanashi M, Oikawa K, Mingli Xu, Mukai K, Kuroda M, Mukai K. Expression of G-protein-coupled receptor kinase 4 is associated with breast cancer tumorigenesis. *J Pathol, 216: 317-327, 2008.*
5. Oikawa K, Akiyoshi A, Tanaka M, Takanashi M, Nishi H, Isaka K, Kiseki H, Idei T, Tsukahara Y, Hashimura N, Mukai K, Kuroda M. Expression of various types of alternatively spliced WAPL transcripts in human cervical epithelia. *Gene, 423:57-62, 2008.*
6. Oikawa K, Yoshida K, Takanashi M, Tanabe H, Kiyuna T, Ogura M, Saito A, Umezawa A, Kuroda M. Dioxin interferes in chromosomal positioning through the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun, 374:361-364, 2008.*
7. 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. 学会発表

1. Kuroda M, Therapeutic Silencing of an Endogenous Gene by the siRNA Cream in an Arthritis model Mouse. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, Therapeutic Modulation of RNA Using Oligonucleotides, Canada, Feb 8-13, 2009.
2. 鈴木理英子、及川恒輔、田中正視、高梨正勝、黒田雅彦 脂肪細胞分化に関与する microRNA の探索 第 31 回日本分子生物学会年会