

2009240/2A

別紙1

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 後藤 典子
平成22(2010)年 5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	1
後藤 典子	
II. 分担研究報告	
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及び解析	8
河野 隆志	
2. 機能性RNA(ncRNA)の研究	10
黒田 雅彦	
3. バイオインフォマティクス技術開発	14
宮野 悟	
4. 肺がんのプロテオミクス解析	16
野村 将春・西村 俊秀	

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、がん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。正常肺上皮細胞を用いた HER シグナル伝達遺伝子制御モデルの解析から、早期肺がんの予後を予測する画期的遺伝子シグネチャーを得た。本邦肺腺がん症例 230 例に及ぶ遺伝子プロファイリングを行い、このシグネチャーの評価を行ったところ、欧米だけでなく、本邦の肺腺がんの予後予測にも有用であることが明らかになった。そして、イレッサ耐性肺がんの新たな分子機構として、N-cadherin の発現亢進による、N-cadherin 依存性がんの存在が示唆された。N-cadherin は、イレッサ抵抗性の肺がんにおける新規分子標的候補となる。さらに、乳がん幹細胞の解析より、NFkB を新規分子標的候補として同定した。また、プロテオミクスホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた網羅的プロテオーム解析より、肺腺がんにおいてステージや転移に関係するバイオマーカー候補が同定された。そして、ncRNA の解析より、HER1 の標的 miRNA の単離に成功した。今後臨床検体を用いたさらなる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 教授

宮野 悟 東京大学医科学研究所 DNA 情報解析分野 教授

野村 将春 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 講師

西村 俊秀 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 客員教授

A. 研究目的

まず、状態空間モデルなどのパスウェイ解析やシミュレーションを用いた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(後藤、河野、宮野)。その研究成果から得られた、新規バイオマーカー及び革新的分子標的を用いてがんの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。本研究にて早期肺がんの画期的予後予測シグネチャー、新規バイオマーカー並びに分子標的候補がすでに得られているので、この実用化を目指す。今年度は、EGFR、KRASがん遺伝子変異情報の付随した手術症例における遺伝子発現プロファイリングを行うことにより、本研究にて同定された予後予測遺伝子群の検証を行うと共に、同遺伝子群の発現動態の生物学的・病理学的意義を追及する。

多くの固形がんにおいて、HERファミリーを分子標的とするイレッサなどの抗がん剤の適応を

決定するバイオマーカーの開発が急務であるので、HERファミリー分子の異常が関わるがんを統合的に理解する研究をさらに進める。また、乳がん幹細胞の分子標的候補を抽出し、その検証を行う。

プロテオミクス解析では、肺がんの早期診断マーカーの発見と応用をめざす(野村、西村)。治療反応性や予後など様々な臨床データが揃っている検体を解析するため、出てきたデータのvalidationが容易である。我々はこれまでに予後の判明した肺腺がん症例を進行度に従った症例群に分けてプロテオミクス解析を行い、進行度と予後の合致しない症例において検出された蛋白質に基づき、予後に応じた新たなグループ分けが出来る事を示したので、さらに、それぞれの肺がんの病理組織学的な形態の特徴を加味した解析を行い、それぞれの症例群に特徴的な蛋白質を新たに示す。

システム生物学的手法にて、がんの制御を行う分子を標的とするmiRNAの特定を行えるアルゴリズムの構築を行う（黒田）。これを用いて網羅的解析を行い、HER1を標的とするmiRNAの単離を試みる。

B.研究方法

1.肺腺がん予後予測シグネチャーの評価と解析

システム生物学的解析より得た139遺伝子シグネチャーを用いて、米国NCIプロジェクト(442例)始め、ウェブにて公開されている肺がん遺伝子発現マイクロアレイ情報を用いて、評価を行う。同時に、本邦肺腺がん遺伝子発現プロファイリングを用いて、評価を行う。評価に用いる判別機(classifier)は、トレーニングセットを用いて構築したものをそのまま用いて、これまでの報告では実現されていなかった客観的評価を行う。

2. イレッサなどのHERファミリー分子標的薬の効果予測新規バイオマーカー並びに新規分子標的の研究

イレッサ感受性PC9肺がん細胞株及びイレッサ耐性亜株の包括的時系列遺伝子発現データ、正常肺上皮細胞のデータ、Cell Illustratorを用いて構築したHERファミリーシグナルネットワークの大規模動的モデルを「ゲノム同化法」により統合させ、動的システムの変異の抽出を行う。

3. 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及び解析

河野の項に記述。

4. バイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

5. 乳がん幹細胞の研究

すでに得られている新規バイオマーカー並びに新規分子標的候補について、機能解析並びに臨床検体を用いた評価を行う。特に、前年度までの研究から、NFkBの活性化を起きている可能性が示唆されているので、これに注目する。さらに、乳がん幹細胞を濃縮させる考えられるスフェア培養

の系を立ち上げ、がん幹細胞のシステム生物学的解析の実験系の構築を行うと共に、新規バイオマーカー並びに分子標的候補の機能解析を進める。

6.肺がんのプロテオミクス解析

野村の項に記述。

7. 機能性RNA(ncRNA)の研究

黒田の項に記述。

(倫理面への配慮)

生検・手術標本を用いる研究は、病理学的検索の後に残った組織を対象として行い、研究対象者から同意を得た上で、検体は匿名・コード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行う。全ての研究は、原則的には研究者が所属する施設の倫理規定に基づいて行い、あらかじめ倫理委員会の承認が必要な研究に関しては研究開始前に当該研究施設で所定の手続きをとった上で進める。動物実験は、所属施設における動物実験の倫理規定に基づき、承認について所定の手続きをとった上で進める。

C.研究結果

1. 肺腺がん予後予測シグネチャーの評価と解析

予後予測遺伝子セットのvalidation解析にはBildら(Nature 2006 vol.439 p353)によって公開されているDuke datasetを用いた。Duke datasetは肺腺がん58症例、扁平上皮がん53症例のAffymetrix社の旧タイプのDNA microarray chipを使用したデータである。オリジナルデータとして使用したSheddenら(Nature Medicine 2008 vol.14 p822)のデータとはサンプル処理のプロトコールも異なっており予後予測は非常に困難であると考えられた。しかしながら本研究で同定した予後予測遺伝子セットである278遺伝子(プローブの違いにより解析では276遺伝子)、139遺伝子のどちらの遺伝子セット

を用いても全ステージの肺腺がんにおいてはlog rank 検定によるP値がそれぞれP=0.0055 (276遺伝子)、P=0.0021 (139遺伝子) という非常に良い値となる事を確認した。加えてstage Iのみの予後予測についても34症例という少ない症例数にも関わらずどちらの遺伝子セットにおいてもP=0.066という精度で予測可能であるという結果を得た。更に驚くべき事にDuke datasetの扁平上皮がん症例と肺腺がん症例mixの状態Stage Iの予後予測が可能か上記と同様に検討した結果、P=0.0043 (276遺伝子)、P=0.040 (139遺伝子) という極めて高精度に予後予測可能であるという結果を得た。

(国際特許出願：2009年12月4日 PCT/JP2009/70386)

さらに、研究項目2にて、河野らにより収集、解析された本邦肺腺がん230例の遺伝子発現プロファイリングを用いて、139遺伝子シグネチャーの再発予測の評価を行った。その結果、本邦肺腺がん症例において、すべての病期のみならず、病期Iの症例においても、再発予後を精度高く予測することができた。

2. イレッサなどのHERファミリー分子標的薬の効果予測新規バイオマーカー並びに新規分子標的の研究

(1) イレッサ耐性肺がん細胞株PC9ZDのイレッサ耐性分子機構の解析

イレッサ感受性肺がん細胞株PC9とイレッサ耐性肺がん細胞株 PC9ZD (Koizumi ら; International Journal of Cancer 2005 vol.116 p36) を用いて比較解析を行った。PC9 及び PC9ZD を agilent 社の DNA マイクロアレイ解析に供しその後 Meta GP 解析を行った結果、PC9ZD で有意に差のある pathway として catenin-cadherin network が抽出された。そこで Microarray によって mRNA の発現の高かった N-cadherin の発現をタンパク質レベルで確認したところ、PC9 と比較し有意な発現量の上昇がみられた。

N-cadherin は EMT のマーカー分子として知られ、その機能は細胞の運動能に関わる事が既に報告されている分子である。肺がんにおいては N-cadherin の発現、つまり EMT を起こしたものはイレッサ抵抗性の傾向があるというデータも報告されている。しかしながら PC9ZD で高発現している N-cadherin やそれら EMT を起こした細胞

におけるイレッサ抵抗性と N-cadherin との関連についての肺がんにおける分子機序については不明である。そこで PC9ZD における N-cadherin とイレッサ抵抗性と関連を調べる為に siRNA による N-cadherin のノックダウン実験を行った。N-cadherin のノックダウンによって PC9ZD の細胞生存率は著しく減少した。また同様の傾向は N-cadherin 中和抗体による実験によっても確認された。これらの結果から、PC9ZD は N-cadherin に addict することでイレッサ抵抗性を獲得したのではないかと推測された。そこで N-cadherin のノックダウンより PC9ZD に細胞死が誘導されているのかどうかについて更に検討を行った。N-cadherin ノックダウンによりリン酸化 Akt のレベルは減少し、TUNEL 陽性細胞、cleaved caspase3 陽性細胞の割合は増加し、またタンパク質レベルにおいても cleaved caspase3 及び cleaved PARP の増加が認められた。Caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK 処理によって N-cadherin ノックダウンによる細胞生存率の減少もレスキューされる事を確認した。加えて N-cadherin ノックダウンによりアポトーシスに特有の DNA ラダーが検出され、N-cadherin ノックダウンによる細胞生存率の減少は caspase3、PARP を介したアポトーシス誘導による結果であると考えられた。

そして、同様の現象が別の N-cadherin を発現している肺がん細胞においてもみられるのかどうかについて

についても検討を行った。検討に用いた A549、H157、H322 細胞は全て N-cadherin 陽性かつ vimentin 陽性の EMT 様細胞であり、イレッサに対して抵抗性の細胞株である事を確認している。これら全ての細胞株において N-cadherin をノックダウンした結果、どの細胞においても程度の差こそあれ細胞生存率の減少を認める事が出来た。

(2) システム生物学的手法によるイレッサ耐性分子機構並びにイレッサ効果予測マーカーの探索

PC9 細胞をイレッサ低濃度投与下で長期間培養することにより、PC9 イレッサ耐性細胞株の樹立を行った。細胞株は、約 50 株樹立できた。その中で、システム生物学解析に適当と考えられる細胞株の選別を行い、10 株を得た。さらに、1 株に選別し (PC) GR2)、この細胞と PC9 親株を培養し、24 時間の時系列で EGF 刺激し、詳細時系列にて RNA を抽出、DNA マイクロアレイ解析に供した。

3. 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及び解析

河野の項に記述。

4. バイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

5. 乳がん幹細胞の研究

MCF7細胞株のCD24^{-low}CD44⁺乳がん幹細胞画分におけるNF-κB活性を検討したところ、CD24^{-low}CD44⁺画分では対照群のCD24⁺CD44⁺画分と比べてNF-κBの活性化が認められた。またNF-κBインヒビターであるDHMEQの投与により、HCC1954細胞株のCD24^{-low}CD44⁺乳がん幹細胞画分におけるNF-κB活性は大きく減少した。さらにDHMEQ投与により、CD24^{-low}CD44⁺乳がん幹細胞画分ではIL8、CCL5の発現低下が認められた。

乳がん幹細胞スフェア培養モデルを確立した。具体的には8種類のヒト乳がん細胞株(MCF-7、HCC1954、HCC38、T47-D、BT-474、HCC70、MDA-MB-231、MDA-MB-436)を用いてスフェアの培養を試みた。In vitroでEGF(epidermal growth factor)等を含む無血清培地を用いて浮遊培養することによりスフェアを形成させ結果、MDA-MB-231、MDA-MB-436を除く6種の細胞株でスフェアの形成が認められた。また、スフェア形成能を持つ細胞の頻度は細胞株ごとに多少の差異を認めたが、いずれも低頻度(約0.5%-4.0%程度)であった。そこでMCF-7とHCC1954について、スフェア構成細胞と通常の接着培養細胞におけるNF-κB活性を比較したところ、どちらの細胞株もスフェアではNF-κB活性が高いことがわかった。さらにスフェア培養時にDHMEQを投与すると、MCF-7、HCC1954ともに、スフェアの形成効率はDHMEQの濃度依存的に低下した。DHMEQトリートメント後に得られたスフェアをシングルセルに分散してからもう一度スフェア培養を行っても、やはりスフェアの形成効率は低いままであった。

さらに、前年度までのDNAマイクロアレイ解析により、得られた候補分子のうち、KLF5のsiRNAにて処理すると、乳がんスフェア形成能が低下することがわかった。

6. 肺がんのプロテオミクス解析

野村の項に記述。

7. 機能性RNA(ncRNA)の研究

黒田の項に記述。

D.考察

1. 肺腺がん予後予測シグネチャーの評価と解析

これまでに得た結果は、本研究で同定した肺腺がんの予後予測遺伝子の精度と汎用性がこれまで報告されてきたどの遺伝子セットよりも優れている事を示唆している。さらに、本邦症例にても、有用性が確認され、世界標準となる診断薬への実用化への目処が立った。これが実用化されれば、術後補助化学療法の恩恵を受ける「再発高危険度群」の選別を行い、肺がん患者の予後を改善できると考えられる。

2. イレッサなどのHERファミリー分子標的薬の効果予測新規バイオマーカー並びに新規分子標的の研究

(1) イレッサ耐性肺がん細胞株PC9ZDのイレッサ耐性分子機構の解析

肺腺がんイレッサ耐性の新たな分子機構として、がん遺伝子中毒に陥ったがんが、EGFシグナル依存からN-cadherin依存へと変化する可能性があることを見いだした。N-cadherinは、イレッサ耐性がんの新たな分子標的候補である。

(2) システム生物学的手法によるイレッサ耐性分子機構並びにイレッサ効果予測マーカーの探索
バイオインフォマティクス解析を進めることにより、これまで同様に、新たなイレッサ耐性分子機構並びにHER分子標的薬効果予測マーカーが得られると期待される。

3. 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及び解析

河野の項に記述。

4. バイオインフォマティクス技術開発

宮野の項に記述。

5. 乳がん幹細胞の研究

乳がん幹細胞ではNF- κ Bが活性化しており、IL8やCCL5等のケモカインの発現を制御していることが示唆された。また、NF- κ Bは乳がん幹細胞の自己複製を規定していることが示唆された。

さらに、KLF5が、乳がん幹細胞の自己複製能に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、臨床検体を用いた評価解析を進めていく予定である。

6. 肺がんのプロテオミクス解析

野村の項に記述。

7. 機能性RNA(ncRNA)の研究

黒田の項に記述。

E. 結論

システム生物学をキーワードに、トランスクリプトーム、プロテオミクス、バイオインフォマティクスのこれまでにない形態での共同研究は、画期的な成果が出た。この成果は、国内国際学会での発表、招待講演、論文発表として世界へ発信されている。さらに、知的財産の獲得、実用化へと着実な筋道がつけられている。本研究をさらに発展させることにより、21世紀の医療として注目されているがんの個別化医療へ着実に進めるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kojima, K., Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Ueno, K., Higuchi, T., Gotoh, N., Miyano, S.: *Genome Inform.*, 22, 56-68, 2010.

Iejima, D., Takenaka, K., Minegichi, Y., Watanabe, M., Huang, L., Watanabe, T., Tanaka, F., Kuroda, M. and

Gotoh, N.: FRS2 β , a potential prognostic gene for non-small cell lung cancer, encodes a feedback inhibitor for EGF receptor family members via ERK binding. *Oncogene*, in press.

Sato, T., Shimazaki, T., Naka, H., Fukami, S., Okano, H., Lax, I., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: FGF-FRS2 α -Erk axis controls a self-renewal target Hes1 and growth of neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.*, in press.

Kojima, K., Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Ueno, K., Higuchi, T., Gotoh, N., Miyano, S. A state space representation of VAR models with sparse learning for dynamic gene networks. *Genome Informatics*. 22:56-68, 2009.

Murohashi, M., Hinohara, K., Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., Umezawa, K., Tojo, A., Aburatani, H. and Gotoh, N.: Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British J. Cancer*, in press.

Murohashi, M., Nakamura, T., Tanaka, S., Ichise, T., Yoshida, N., Yamamoto, T., Shibuya, M., Schlessinger, J. and Gotoh, N.: An FGF4-FRS2 α -Cdx2 axis-in trophoblast stem cells induces BMP4 to regulate proper growth of early mouse embryos. *Stem Cells*, in press.

Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L.-Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koeffler, P. and Ogawa, S.: Gain-of-function of mutated c-Cbl tumor suppressor in myeloid neoplasms with 11q uniparental disomy. *Nature*, 460, 904-909.

Iejima, D. and Gotoh, N.: FRS2 β docking/scaffolding adaptor protein. *Current research in cancer, Research Media, India*, 3, 99-107, 2009.

Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki, T. and Gotoh, N.: FRS2 α 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. *Nature Molecule Pages* doi:10.1038/mp.a004122.01, 2009.

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*, 13, 689-700, 2009.

Sato, T. and Gotoh, N.: Frs2alpha. *Nature Molecule Pages*, doi:10.1038/mp.a000967.01, 2009.

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.

2.学会発表

The 16th East Asia Joint conference on Biomedical Research

“Growth factor signaling systems identify critical genes for survival prediction in lung adenocarcinoma”

2009年9月 招待講演

68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

第68回日本癌学会学術総会、シンポジウム

“Exploration of new biomarkers and molecular targets of lung carcinoma by systems biology approach”

2009年10月 招待講演

14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine

“A key role of NF- κ B pathway in breast cancer stem

cells for tumorigenesis.

2009年10月 招待講演

Mai Yamauchi, Rui Yamaguchi, Masao Nagasaki, Teppei Shimamura, Seiya Imoto, Ayumu Saito, Kazuko Ueno, Yousuke Hatanaka, Ryo Yoshida, Tomoyuki Higuchi, Takashi Kohno, Jun Yokota, Satoru Miyano, Noriko Gotoh.

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

American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 2009

2009年4月

Colorado Convention Center, Denver, Colorado, USA

Mai Yamauchi, Rui Yamaguchi, Masao Nagasaki, Teppei Shimamura, Seiya Imoto, Ayumu Saito, Kazuko Ueno, Yousuke Hatanaka, Ryo Yoshida, Tomoyuki Higuchi, Takashi Kohno, Jun Yokota, Satoru Miyano, Noriko Gotoh.

“Growth factor signaling systems identify critical genes for survival prediction in lung adenocarcinoma”

The 10th International Conference on Systems Biology

2009年8月

Stanford, California, USA

山口類, 井元清哉, 山内麻衣, 長崎正朗, 吉田亮, 島村徹平, 樋口知之, 後藤典子, 宮野悟

“状態空間モデルからの動的予測に基づく遺伝子発現制御関係の差異の探索”

2009年度 統計関連学会連合大会

2009年9月

Mai Yamauchi, Takashi Khono, Jun Yokota, Noriko Gotoh

“Growth factor signaling systems identify critical genes for survival prediction in lung adenocarcinoma”

68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association

第68回日本癌学会学術総会

2009年10月

日野原邦彦, 室橋道子, 黒田雅彦, 砂川孝行, 辻真吾, 小林誠一郎, 梅澤一夫, 東條有伸, 油谷浩幸, 後藤典子

“Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells”

第32回日本分子生物学会

2009年12月

室橋道子、日野原邦彦、黒田雅彦、砂川孝行、辻真吾、小林誠一郎、梅澤一夫、東條有伸、油谷浩幸、後藤典子

“ヒト乳癌細胞株における癌幹細胞の分子シグネチャー”

第 68 回日本癌学会学術総会

2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

国際特許出願：2009年12月 PCT/JP2009/70386

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。

II. 分担研究者報告

【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及び解析】

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

肺がんにおける予後予測に有用なバイオマーカー遺伝子群を同定する。特に今年度は、EGFR、KRAS がん遺伝子変異情報の付随した手術症例における遺伝子発現 profiling を行うことにより、同定された予後予測遺伝子群の関連の検証を行うと共に、生物学的意義を追及する。

B. 研究方法

- 1) I・II 期肺腺がん手術組織における EGFR・KRAS 遺伝子の体細胞変異を同定する。
- 2) EGFR、KRAS がん遺伝子変異情報の得られた肺腺がん手術検体より、RNA を抽出し、遺伝子発現 profiling を行う。これまでに同定した予後予測遺伝子群の有用性を validation する。
(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

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。その中から予後予測signatureの評価に用いるべき病期I-II期の標本230例を同定した。同例の液体窒素凍結保存された腫瘍標本より、ゲノムDNAおよびTotal RNAを抽出した。また、年齢・性別・喫煙歴・病期・治療歴・無再発生存期間・全生存期間の情報を取得した。

- 2) 遺伝子変異の検索及び、遺伝子発現profileの取得

ゲノムDNAを対象に、HRMA(High-resolution

melting analysis)法を用いてEGFRおよびKRAS遺伝子変異を検索した。両変異は相互排他的に生じており、その頻度はそれぞれ50%、10%であった。5年以内再発例60例を含む230例について、現在、Affymetrics社のU133Plus ver.2チップを用いて、遺伝子発現profileの取得を取得した。後藤研究代表者の同定したEGFR経路遺伝子群からなる予後予測classifierを用いて、再発予後との関連解析を行った。その結果、I期肺がんの再発と統計学的に有意な関連を見出し、比例ハザード比=3.8 (95%信頼区間=2.4-5.9、 $P=4.0 \times 10^{-9}$)であった。また、このclassifierは腫瘍径とは独立の予後因子であることが示唆された。

D. 考察

本研究課題内で構築された予後予測signatureが、欧米だけでなく、本邦の肺腺がんの予後予測にも有用であることが明らかになった。腫瘍径とは独立に予後との関連が示されたことから、術後補助療法の対象となっていないIA期の肺腺がんからの再発高危険度群の抽出が可能である可能性もある。今後の解析課題としていきたい。今後、予後予測signature 遺伝子群を搭載したカスタムチップを体外診断薬として開発することで、術後補助化学療法の恩恵を受ける「再発高危険度群」の選別を行い、肺がん患者の予後を改善できると考える。

本研究で用いる標本には、これまでの欧米での研究と異なり、喫煙歴やEGFRおよびKRAS遺伝子変異の情報が付随している。そこで、遺伝子発現と予後との関連において、喫煙や発がん経路による特異性・相互作用を明らかにすることができる。よって、本研究や他の研究で構築された予後予測signatureの感度、性能に関する詳細な比較・検討が可能である。また、その解析結果は、難治がんである肺がんの悪性度の本態解明のための基盤情報となる。また、本研究で得られる遺伝子発現profileは、今後、自身らや他の研究者が提案する予後予測signatureの評価にも有益である。

E. 結論

本研究課題内で構築された予後予測signature が、

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kohno T, Otsuka A, Girard L, Sato M, Iwakawa R, Ogiwara H, Sanchez-Cespedes M, Minna JD, Yokota J. A catalog of genes homozygously deleted in human lung cancer and the candidacy of PTPRD as a tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer*; 49: 342-352, 2010.

Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, Shiraishi K, Ishii Y, Goto K, Ohe Y, Nishiwaki Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Hirose H, Oka A, Yanagitani N, Saito R, Inoko H, Yokota J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis*; 31: 834-841, 2010.

Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, Moriguchi T, Kiyono T, Morishita K, Sanchez-Cespedes M, Akiyama T, Yokota J. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. *Lung Cancer*, in press, 2010.

Suizu F, ..., Kohno T, Yokota J*, ..., Noguchi M. The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell* 17: 800-810, 2009.

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* 30: 65-70, 2009.

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.

Blanco R, Iwakawa R, Tang M, Kohno T, Angulo B, Pio R, Montuenga LM, Minna JD, Yokota J, Sanchez-Cespedes M. A gene-alteration profile of

欧米だけでなく、本邦の肺腺がんの予後予測にも有用であることを明らかにした。

human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 30: 1199-1206, 2009.

2. 学会発表

Yamauchi M, Kohno T, Yokota J, Gotoh N. Growth factor signaling systems identify critical genes for survival prediction in lung adenocarcinoma.

日本癌学会総会 (2009年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

癌の予後予測シグネチャー (特願 2008-311481)
特許出願 2009年2月

2. 実用新案登録

なし。

【機能性 RNA(ncRNA)の研究】

分担研究者 黒田 雅彦 東京医科大学 病理学部 教授

A. 研究目的

肺癌は予後不良の疾患であり、数々の治療薬が開発されている。中でも上皮成長因子 (EGFR) を標的とする治療分子標的薬はゲフィチニブ (イレッサ®) を始めとして数多く用いられているが、世に出ているが、その効果は未だ限定的である。満足行くものではなく、したがってこれらに変わる新しい治療方法が期待されている。

一方、近年、miRNA と称される RNA 分子が、構造的または触媒機能や制御機能において非常に多様性があることが示され始めている。ゲノム上に相当数の miRNA 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 miRNA の機能解析は不可欠と言われる。特に 2005 年に癌遺伝子として機能している mi-17-92 が同定されて以来 (Nature 2005, 435, 828)、癌と miRNA の関与の研究が爆発的に行われている。このような背景から、今回我々は、EGFR に対する microRNA を網羅的に解析することにより、EGFR の発現を抑制し、肺癌の増殖を抑制する事により抗癌作用を得る microRNA を検討した。

B. 研究方法と結果

今年度は以下の検討を行った。

(1)EGFR を標的とする miRNA プレートの作製：

miRBase を基本としたコンピューター解析を用いてすべての変異型 EGFR を標的とする可能性のあるマイクロ RNA (miRNA) を 88 種類選出した。特に EGFR は、肺癌において変異があるため、すでに報告されている変異部位も考慮して候補 miRNA を選定した。その後この miRNA を 96well plate にトランスフェクション試薬とともに添付した。

(2) 肺癌細胞株を用いた検討：

上記 96 well plate に肺癌細胞株 A549,H3255,HCC827 を培養し、リアルタイム PCR にて EGFR の発現を検討した。さらにウェスタンブロッティングを用いて、EGFR の発現を抑制する miRNA を 7 種類同定した。

(3)MTT アッセイによる検討：

上記 7 種類の miRNA 細胞増殖を抑制するかについて MTT アッセイを行い検討した。この中で特に miR-542-3p と miR-542-5p が、肺癌細胞株に対して、増殖抑制効果を認めた。

C. 考察

今回、EGFR に結合する可能性のある 88 種類の異なる microRNA について EGFR の発現抑制及び細胞増殖抑制についての実験を行った。その結果、幾つかの miRNA が最も EGFR の発現抑制及び細胞増殖抑制能力を持つことがわかった。これらの miRNA は、すでに報告されている 4 種類の EGFR 遺伝子の variant とのいずれにも結合する。また、我々の検討では、すでに報告されている EGFR の target である miR-7 は肺癌細胞細胞の増殖を抑制しなかった。これらの結果を考えるとこれらの miRNA が EGFR を標的とした治療に有効である可能性が高い。

D. 結論

今回我々は、EGFR の標的 miRNA の単離に成功した。現在の EGFR の分子標的治療薬は、抗体医薬や低分子化合物による手法が中心であるが、既存の手法では、治療効果がない症例も存在する。このような症例に対して、miRNA は新たな治療法の選択肢となる可能性を秘めている。一方、miRNA などの核酸医薬はドラッグデリバリーシステムが問題となる。今後は、miRNA 治療において、安全で効率的なドラッグデリバリーシステムの確立に関して研究をすすめていきたい。

原著論文：

1. Masatoshi Shigoka, Akihiko Tsuchida, Takaaki Matsudo, Yuichi Nagakawa, Hitoshi Saito, Yoshiaki Suzuki, Tatsuya Aoki, Yoshiki Murakami, Hidenori Toyoda, Takashi Kumada, Ralf Bartenschlager, Nobuyuki Kato, Masanori Ikeda, Tomoki Takashina,

- Masami Tanaka, Rieko Suzuki, Kosuke Oikawa, Masakatsu Takanashi, Masahiko Kuroda. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathology International*. 60(5) 351-7 May 2010.
2. Lina Zhang, Juan Ma, Masaru Takeuchi, Yoshihiko Usui, Takaaki Hattori, Yoko Okunuki, Naoyuki Yamakawa, Takeshi Kezuka, Masahiko Kuroda, Hiroshi Goto. Suppression of Experimental Autoimmune Uveoretinitis by Inducing Differentiation of Regulatory T Cells via Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51(4):2109-17 Apr 2010.
3. Iejima D, Minegishi Y, Takenaka K, Siswanto A, Watanabe M, Huang L, Watanabe T, Tanaka F, Kuroda M, Gotoh N. FRS2beta, a potential prognostic gene for non-small cell lung cancer, encodes a feedback inhibitor of EGF receptor family members by ERK binding., *Oncogene*. 2010 Mar 15. [Epub ahead of print]
4. Tadashi Ohtomo, Keisuke Miyazawa, Munekazu Naito, Shota Moriya, Masahiko Kuroda, Masahiro Itoh and Akio Tomoda. Cytoprotective Effect of Imatinib Mesylate in Non-BCR-ABL-expressing Cells and Autophagosome Formation. *BBRC*.;391(1):310-5. Jan 1 2010.
5. Michiko Murohashi, Kunihiko Hinohara, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji, Seiichiro Kobayashi, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo, Hiroyuki Aburatani and Noriko Gotoh. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signaling pathways in breast cancer stem cells. *British journal of cancer*. 2010 Jan 5;102(1):206-12.
6. 木下 雅雄, 稲田 秀洋, 伊藤 哲思, 松林 純, 黒田 雅彦, 池田 徳彦. 多中心性発生と考えられた同時性多発胸腺腫の1例. 日本呼吸器外科学会雑誌. 23(7):59-63 Nov 2009. (Masao Kinoshita, Hidehiro Inada, Tetsushi Ito, Jun Matsubayashi, Masahiko Kuroda, Norihiko Ikeda. A case of synchronous multiple thymoma of multi-centric origin.)
7. Kosuke Oikawa, Yoichi Matsuda and Masahiko Kuroda. Effects of Environmental Chemicals on Cell Division and Chromosomal Positioning. *Reproductive Immunology and Biology*.24(2):70-76 Nov 2009.
8. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*. 14(7):529-38 Nov 2009.
9. Ryota Higuchi, Fumiko Nakamura, Yoshinori Matsuura, Katsuya Hattori, Hiroaki Suda, Hironori Kawazaki, Akihiko Ohta, Masahiko Kuroda, Jyun Matsubayashi. Mucinous Carcinoma of the Rectosigmoid Colon, Transforming from a Pedunculated (Ip type) Polypoid Cancer in about One Year, Report of a Case. *Stomach and Intestine(Tokyo)*. 44(11):1777-84 Oct 2009. (有茎性ポリープから発育進展して大腸粘液癌の1例/早期胃癌研究会症例. 胃と腸 第44巻 第11号 別冊)
10. Xu M, Takanashi M, Oikawa K, Tanaka M, Nishi H, Isaka K, Kudo M, Kuroda M. USP15 plays an essential role for caspase-3 activation during Paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 16;388(2):366-371 Oct 2009.
11. 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*, 16(8): 982-989 Aug 2009.
12. Takeuchi A, Takeuchi M, Oikawa K, Sonoda K, Usui Y, Okunuki Y, Takeda A, Oshima Y, Yoshida K, Usui M, Goto H, Kuroda M. Effects of Dioxin on Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) Production in the Retina Associated with Chroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.;50(7):3410-6, Jul 2009.

13. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K, Kuroda M. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. PloS ONE 4 (5): e5532., May 2009.

総説その他：

1. 黒田雅彦、田中正視、及川恒輔、水谷隆之、大屋敷純子、大屋敷一馬：癌のバイオマーカーとしての microRNA 実験医学、Vol.27 No.8, 1223-1227, 2009.

学会発表：

1. 高梨 正勝, 須藤 カツ子, 石川 章夫, 黒田 雅彦 骨髄間葉系幹細胞による皮膚炎モデルマウスへの症状の抑制効果について. 第 99 回日本病理学会総会, 2010 年 4 月
2. 藤田 浩司, 田中 正視, 高梨 正勝, 黒田 雅彦 LNA probe を用いた in situ hybridization による miRNA の検出. 第 99 回日本病理学会総会, 東京, 2010 年 4 月 Kunihiko Hinohara, Michiko Murohashi, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji, Seiichiro Kobayashi, Kazuo Umezawa, Arinobu Tojo, Hiroyuki Aburatani, Noriko Goto. Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells. Washington, DC USA. AACR, 101st Annual Meeting April 17-21, 2010
3. Masami Tanaka, Akihiko Tsuchida, Masatoshi Shigoka, Tetsuya Aoki, Tomoki Takashina, Masakatsu Takashina, Yoshiki Murakami, Masahiko Kuroda. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. Washington, DC USA. AACR, 101st Annual Meeting April 17-21, 2010
4. Kunihiko Hinohara, Michiko Murohashi, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji, Seiichiro Kobayashi, Kazuo Umehara, Arinobu Tojo, Hiroyuki

Aburatani, Noriko Gotoh. Potential roles of NF- κ B pathways in breast cancer-initiating cells. 第 32 回日本分子生物学会年会(MBSJ2009)、2009 年 12 月

6. Masami Tanaka, Rieko Suzuki, Yoshiki Murakami, Hidenori Toyoda, Takaaki Matsudo, Masatoshi Shigoka, Akihiko Tsutida, Tatsuya Aoki, Junko Ohyashiki, Kazuma Ohyashiki, Masahiko Kuroda. Circulating microRNAs in plasma as novel biomarkers. (新規バイオマーカーとしての血清中 microRNA.) 第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、2009 年 12 月

7. Kosuke Oikawa, Masami Tanaka, Shunji Ito, Masakatsu Takanashi, Kohsaku Uetani, Yasuteru Muragaki, Masahiko Kuroda. The chimeric oncoprotein TLS - CHOP represses the expression of an anticancer molecule through induction of specific microRNAs. 第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、2009 年 12 月

8. Masakatsu Takanashi, Kosuke Oikawa, Katsuko Sudo, Masami Tanaka, Susumu Nakae, Masahiko Kuroda. Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. 第 32 回日本分子生物学会年会(MBSJ2009)、2009 年 12 月

9. Rieko Suzuki, Masami Tanaka, Hiroo Toyoda, Masahiko Kuroda. Bilberry extract inhibits adipocyte differentiation.(ビルベリー抽出液による脂肪分化阻害効果). 第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、2009 年 12 月

10. Masami Taknaka, Kosuke Oikawa, Kazuma Ohyashiki, Junko Ohyashiki, Masahiko Kuroda Down-regulation of miR- in human plasma is a novel marker for acure leukemia patients. (急性白血病における血清 miRNA の解析.) 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. (第 68 回 日本癌学会学術総会)、2009 年 10 月

11. Michiko Murohashi, Kunihiko Hinohara, Masahiko Kuroda, Takayuki Isagawa, Shingo Tsuji,

Hiroyuki Aburatani, Noriko Gotoh. Molecular signatures of tumor-initiating cells in human breast cancer cell lines.(ヒト乳癌細胞株における癌幹細胞の分子シグネチャー). 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. (第 68 回 日本癌学会 学術総会) 、2009 年 10 月

12. Nobuyuki Kosaka, Yusuke Yamamoto, Yoshiki Murakami, Masahiko Kuroda, Takahiro Ochiya. Oncofetal microRNA as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. 血清中のがん胎児性特異的マイクロ RNA を用いた腫瘍マーカーの検討. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. (第 68 回 日本癌学会学術総会) 、2009 年 10 月

13. Tadashi Ohtomo, Keisuke Miyazawa, Masahiko Kuroda, Akio Tomoda. Autophagy Inducing Effect of Imatinib Mesylate in Non-BCR-ABL Expressing Cells along with Suppression of ER Stress. (メシル酸イマチニブに BCR-ABL 非発現細胞における ER ストレス抑制を伴うオートファジー誘導効果.) 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. (第 68 回 日本癌学会学術総会) 、2009 年 10 月

14. 黒田雅彦 miRNA による癌診断の臨床応用. 第 1 回日本 RNAi 研究会、2009 年 8 月

15. 黒田雅彦, 高梨正勝, 工藤玄恵, 松林純, 長尾俊孝, 斉藤彰, 田伏洋, 木下雅雄 乳癌における G protein-coupled Receptor Kinase 4 の役割とその関連分子の同定 第 5 回日本臨床プロテオーム研究会, 2009 年 5 月

16. Mingli Xu, Masakatsu Takanashi, Kosuke Oikawa, Masami Tanaka, Hiroataka Nishi, Keiichi Isaka, Motoshige Kudo, Masahiko Kuroda. A functional genomic screen identifies a role of USP15 and Septin 10 in spindle-checkpoint and Paclitaxel-resistance in human cancers. Denver, Colorado USA. AACR, 100th Annual Meeting April 18-22, 2009

学会座長等：

1. 黒田雅彦 (座長)：細胞接着と浸潤・転移 (2) 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10.)
2. 黒田雅彦 (座長)：東京医科大学医学会総会 (2009.6.)

取材等：

1. 黒田雅彦 / NEC：IT でがん診断、精度高く、NEC「病理医の目」再現。
日本経済新聞 2009 年 11 月
2. 黒田雅彦：リウマチ治療塗るだけ。東京医大が候補物質
日本経済産業新聞 2009 年 9 月

【バイオインフォマティクス技術開発】

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

本研究のシステム生物学的解析に有用なバイオインフォマティクス技術開発を行う。

B. 研究方法

がん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。

C. 研究結果

1. 肺腺がん予後予測シグネチャーの評価と解析

139 個の遺伝子からなる遺伝子シグネチャーによる予後予測能力の検証

昨年度は、ヒト肺正常細胞 (SAEC) への Gefitinib 投与および非投与条件の下得られた二種の時系列遺伝子発現データに対し、我々が開発した状態空間モデルによる遺伝子間制御関係の差異探索手法を適用し、139 個の遺伝子からなる遺伝子シグネチャーを抽出した。そのシグネチャーを入力とする判別機から出力されるリスク値により患者を二群に分けた結果、初期(Stage1)肺腺がん患者の予後予測に成功した。その際、判別機の学習および検証用データには Shedden *et al.*, Nature Genetics, 2008 の肺腺がん患者コホートのマイクロアレイデータを使用した。本年度は、更なる検証として別のコホートからのデータに対し昨年度構築した判別機を適用し予後予測を行った。使用したデータは Duke 大学のグループによる肺腺がん患者のマイクロアレイデータ (Bild *et al.*, Nature, 2006) である。その結果、同データにおいても実験プロトコルやプラットフォームの違いにも関わらず初期肺腺がん患者の予後予測が有意に可能であり同遺伝子シグネチャーの高い汎用性を確認した。

MetaGP 解析による新規薬剤耐性機構に関わる遺伝子群の探索

Gefitinib への耐性が異なる肺がん細胞株間 (PC9, PC9ZD) において、どのようなパスウェイの活動度に差異が生じているかを知るために、我々が開発した手法 MetaGP を適用した。MetaGP は遺伝子セットで定義された何らかの機能モジュール (例: パスウェイ) の活動度の差異を、ケース・コントロール細胞間における個々の遺伝子発現差情報を統計的メタアナリシスにより統合することで検定する。その結果、新規薬剤耐性機構に関わる可能性のある遺伝子群の抽出に成功し、現在実験により検証中である。

2. バイオインフォマティクス技術開発

状態空間モデルによる薬剤作用点探索のための新規手法の開発

薬剤投与・非投与の条件下で得られた二種の時系列遺伝子発現データから、遺伝子間制御システムに対する外生擾乱としての薬剤効果の動的プロファイルを抽出するための状態空間モデルに基づく新規手法を開発している。前述のヒト肺正常細胞への Gefitinib 投与および非投与の条件下で得られた時系列遺伝子発現データに適用することで新規薬剤作用点候補の探索を進めている。

Cell Illustrator による EGFR パスウェイの動的モデリングと状態空間モデルによるシミュレーションモデルの融合

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、EGFR の変異による IRS 耐性株と正常株との比較を行い、このパスウェイの動的挙動に関する知見、実データの計測結果と一致しない部分の検討を行った。また、状態空間モデルで推定されたネットワークを Cell Illustrator 上で表示できるよう改良を行い、文献で報告されている制御を主体とする EGFR のシミュレーションモデルに対して、実データの計測結果と一致しない部分について、状態空間モデルで推定される制御を追加できる枠組みを開発し、新規制御候補の探索を進めている。

D. 考察

さらにバイオインフォマティクス技術開発が進捗した。

E. 結論

システム生物学的解析よりトランスレーショナル研究を行うためのバイオインフォマティクス技術がそろってきた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujita, A., Sato, J.R., Demas, M.A.A, Yamaguchi, R., Shimamura, T., Ferreira, C.E., Sogayar, M.C., **Miyano, S.** Inferring contagion in regulatory networks. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics. In press.*

2. Fujita, A., Sato, J.R., Demas, M.A.A, Sogayar, M.C., Ferreira, C.E., **Miyano, S.** Comparing Pearson, Spearman and Hoeffding's D measure for gene expression association analysis. *J. Bioinformatics and Computational Biology. 7(4): 663-684, 2009.*

3. Kojima, K., Yamaguchi, R., Imoto, S., Yamauchi, M., Nagasaki, M., Yoshida, R., Shimamura, T., Ueno, K., Higuchi, T., Gotoh, N., **Miyano, S.** A state space representation of VAR models with sparse learning for dynamic gene networks. *Genome Informatics. 22:56-68, 2009.*

4. **Miyano, S.**, Yamaguchi, R., Tamada, Y., Nagasaki, M., Imoto, S. Gene networks viewed through two models. *Lecture Notes in Computer Science. 5462: 54-66, 2009.*

5. Nakamura, K., Yoshida, R., Nagasaki, M., **Miyano, S.**, Higuchi, T. Parameter estimation of in silico biological pathways with particle filtering towards a petascale computing. *PSB. 14: 227-238, 2009.*

6. Shimamura, T., Imoto, S., Yamaguchi, R., Fujita, A., Nagasaki, M., **Miyano, S.** Recursive regularization for inferring gene networks from time-course gene expression profiles. *BMC Systems Biology. 3:41, 2009.*

7. Shimamura, T., Imoto, S., Yamaguchi, R., Nagasaki, M., **Miyano, S.** Inferring dynamic gene networks under varying conditions for transcriptomic network comparison. *Bioinformatics. 26(8):1064-1072, 2010.*

8. Tamada, Y., Araki, H., Imoto, S., Nagasaki, M., Doi, A., Nakanishi, Y., Tomiyasu, Y., Yasuda, K., Dunmore, B., Sanders, D., Humphreys, S., Print, C., Charnock-Jones, D.S., Tashiro, K., Kuhara, S.,

Miyano, S. Unraveling dynamic activities of autocrine pathways that control drug-response transcriptome networks. *PSB. 14: 251-263, 2009.*

2. 学会発表 (発表誌名巻号・ページ・発行年等も記入)

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし。

【肺がんのプロテオミクス解析】

分担研究者 野村 将春 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 講師
西村 俊秀 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 客員教授

A. 研究目的

これまで癌の多くは遺伝子の異常によって発症すると考えられてきた。実際に数多くの遺伝子の異常が肺癌を始めとする様々な癌において発見されている。しかし、その中で癌の早期診断のための腫瘍マーカーや、遺伝子治療へと応用出来たものは、ヒトゲノムの全塩基配列が解読された今日においても非常に数少ないのが現状である。遺伝子の異常が癌の発症に関与している事は明らかであるが、実際に病態に関与している物質は遺伝子から生成された蛋白質である。従来、蛋白質の解析は構造が複雑である事などから網羅的な解析は不能とされてきた。しかし 1980 年代後半に田中や Fenn が蛋白質をイオン化させる方法を開発した事により、それが可能となり、さらにその技術は飛躍的に向上している。

ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin Embedded: FFPE) 組織ブロックは病院内に長年にわたり保管されていて、病態、予後、薬の投与歴やその効果などの臨床情報が付随しているという優位性がある。近年、この FFPE 組織からのプロテオーム解析が可能となった。私達はこれらの標本から、マイクロダイセクションにより癌細胞だけを採取し、解析を行い転移や予後に関係する蛋白質や、組織学的に診断が困難な未分化な肺癌に特異的な蛋白質の同定を行った。

B. 研究方法

1. FFPE 組織切片を用いたプロテオーム解析(蛋白質の同定)

FFPE 組織ブロックから切り出した厚さ 10 μ の切片をヘマトキシリンで染色した後、顕微鏡下で特定の領域、細胞をレーザーで打ち抜き回収する。回収された細胞は Liquid TissueTM 技術(Expression Pathology 社)により、ホルマリン処理によるアミノ酸残基間の架橋構造をゆがめトリプシン消化の効率を高められた後にトリプシンで消化された。得られたペプチドの混合物は低流速液体クロマトグラフィー・質量分析(liquid chromatography, mass spectrometry, LC/MS)によって解析された。FFPE 組織サンプルの約 30,000 細胞(約 10 回測定分)から上記システムによる解析で、約 500~

10,000 種類の蛋白質を同定した。

2. 蛋白質の半定量、及び定量法

疾患群間の蛋白質の発現の違いを比較するためには

半定量、及び定量解析が重要となる。私達は半定量法として MS/MS スペクトルのカウント数に基づくスペクトル・カウント法(Spectral counting or Identification-based approach)を行っている。半定量によって各患者群に有意と判定された蛋白質に関しては、標的ペプチド断片のみを選択的定量を行う方法(Selected Reaction Monitoring Mass spectrometry(SRM MS)-based assay)を行う。SRM アッセイによる一回の測定では標的とした蛋白質を一度に 20-200 種類測定出来る。

(倫理面への配慮)

臨床検体に関しては文書によるインフォームドコンセントが得られた症例のみを解析対象とした。

C. 研究成果

1. 肺腺癌におけるステージ バイオマーカー候補の解析

最も頻度の高い肺癌である、肺腺癌の中で、ステージの低いリンパ節への転移のない 14 症例と、ステージの高いリンパ節への転移のある 13 症例で比較した。同定された約 700 種類の蛋白質からスペクトル・カウント法により群間比較を行い、有意な蛋白質、約 80 種類をステージバイオマーカーの候補とした。その中で napsin-A, PPIase, S100-A9, hAG-2 などについて SRM MS 定量アッセイを行った。その結果、hAG-2 は病期が進行すると増加し、napsin-A は逆に減少することが見出された。

2. 肺癌の薬剤感受性バイオマーカー候補の解析

肺癌の中でも特に悪性度の高い小細胞癌(small cell lung carcinoma, SCLC)、大細胞癌(large cell carcinoma, LCC)及び大細胞癌の亜型で小細胞癌的な特徴を有している大細胞神経内分泌癌(large

cell neuroendocrine carcinoma, LCNEC)は予後不良の肺癌として知られている。これらの癌は進行が早く、発見時には既に切除困難な症例が多く化学療法や放射線治療が併用される事が多い。SCLCは基本的に化学療法が奏功するが他の2つのタイプは効果が低い。しかし SCLC と LCNEC は形態学的に鑑別する事が困難な場合がある。そこで3群間の蛋白質の発現を比較し、それぞれ約1,000種類の候補タンパク質を同定した。その中からスペクトル・カウント法により約170種類の候補タンパク質が見出された。その中の44種タンパク質に対して、SRM アッセイを行い LCNEC(4種類),LCC(3種類),SCLC(1種類),LCNEC と SCLC 共通(7種類)のマーカー候補が見いだされた。その中で薬剤感受性に関わると報告されている2つの蛋白質、stathmin と major vault protein (MVP)の市販抗体を用いた免疫染色では症例によって染色パターンが異なり、薬剤感受性との関係が示唆された。

D. 考察

① 肺腺癌においてステージや転移に関係すると思われる蛋白質が解析された。また、ステージの低い症例でもステージの高い症例と同様の蛋白質発現パターンを示す症例や、その逆の症例も観察された。ステージだけでなく、蛋白質の発現パターンにより、予後が予測出来る可能性が示唆された

② 肺癌の中でも特に予後不良の肺癌、SCLC, LCC, LCNEC に特徴的な蛋白質の解析を行った。SCLC と LCNEC の鑑別に有用な蛋白質、薬剤感受性に関与する蛋白質などが同定され診断や治療に応用できる可能性が示唆された。

E. 結論

肺癌は heterogeneity の強い疾患と言われている。従って、個々の症例に関して tailor made therapy が最も必要な悪性腫瘍の一つである。その制圧のための strategy としては早期発見と進行癌の治療である。今回の解析を通して、それに関わる可能性のある蛋白質を一つでも多く見出し、臨床へと応用出来るようにする事がこの研究の最終的な目的となる。今後は細胞株を使った、機能解析やより詳細な臨床データとの相関を解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimura T., Nomura M., Tojo H., Hamasaki H., Fukuda T., Fujii K., Mikami S., Bando Y., Kato H., Proteomic analysis of laser-microdissected paraffin-embedded tissues: (2) MRM assay for stage-related proteins upon non-metastatic lung adenocarcinoma. *Journal of Proteomics* (2010) 73: 1100-10.

2. Kawamura T., Nomura M., Tojo H., Fujii K., Hamasaki H., Mikami S., Bando Y., Kato H., Nishimura T., Proteomic analysis of laser-microdissected paraffin-embedded tissues: (1) Stage-related protein candidates upon non-metastatic lung adenocarcinoma. *Journal of Proteomics* (2010) 73:1089-99.

3. 野村将春、前田純一、加藤靖文、大平達夫、西村俊秀、加藤治文、肺疾患とプロテオーム、日本胸部臨床、第68巻、第7号 (2009)、604-614.

4. Nyberg F., Harbron C. G., Ogiwara A., Kawakami T., Nagasaka K., Takami S., Wada K., Tu H-K., Otsuji M., Kyono Y., Komatsu Y., Kihara M., Akimoto S., Fukuoka M., Nakata M., Nishiwaki Y., Kudoh S., Groth Clausen I., Nishimura T., Marko-Varga G., Kato H., submitted to American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, "Statistical analyses of the utility of protein biomarkers in predicting acute interstitial lung disease (ILD) in drug-treated patients from an epidemiological case-control study"

5. Y. Ohno, M. Izumi, T. Kawamura, T. Nishimura, K. Mukai, M. Tachibana. Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma (2009) *British Journal of Cancer* 101, 287-294.

2. 学会発表

1. 野村将春、松林純、永井毅、高橋礼典、草間博、長尾俊孝、Neuroendocrine differentiation を伴った、Non-neuroendocrine lung cancer の検討。第98回日本病理学会総会 2009年5月

2. 大平達夫、白田実男、一ノ瀬修二、大谷圭志、小林慎吾、及川武史、梶原直央、内田 修、野村将春、平野 隆、池田徳彦、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたマイクロRNA検索による肺癌バイオマーカー研究 第68回日本癌学会学術集会 2009年10月

3. 安藤秀信、尾崎秀徳、白川彩弓、板谷純、福岡順也、南優子、野村将春、野口雅之、榎谷内昌、佐藤隆、池原譲、成松久、肺腺癌細胞株および肺

- 腺癌組織におけるシアリル Tn キャリア蛋白質の同定。第 68 回日本癌学会学術集会 2009 年 10 月
4. 大平達夫、臼田実男、垣花昌俊、佐治久、野村将春、梶原直央、内田修、筒井英光、平野隆 池田徳彦、肺癌検診における臨床細胞診の有用性と今後の展望。第 50 回日本臨床細胞学会春季大会 2009 年 6 月
 5. 野村将春、本田英俊、臼田実男、梶原直央、内田修、大平達夫、池田徳彦、Micropapillary Component 様の組織学的所見が認められた肺腺癌患者の細胞診所見。第 48 回日本臨床細胞学会秋季大会 2009 年 10 月
 6. 佐治久、山口学、野村将春、木村雅一、林博樹、臼田実男、梶原直央、内田修、大平達夫、池田徳彦、超音波気管支鏡下針細胞診にて術前に診断し得た肺硬化性血管腫の 1 切除例。第 48 回日本臨床細胞学会秋季大会 2009 年 10 月
 7. 垣花昌俊、三宅真司、佐治久、梶原直央、臼田実男、内田修、野村将春、大平達夫、長尾俊孝、池田徳彦、肺切除症例の術前および手術材料における、液状検体処理と従来法の検討。第 48 回日本臨床細胞学会秋季大会 2009 年 10 月
 8. Nomura M, Nishimura T, Fukuda T*, Fujii K*, Kawamura T*, Hamasaki H*, Hike H*, Bando Y*, Kato H, Ohira T, Ikeda N, MRM MS-Based Assays to identify biomarkers for large cell neuro-endocrine carcinoma (LCNEC) of lung. 第 5 回日本臨床プロテオーム研究会. 2009 年 5 月
 9. 果然、大平達夫、川上隆雄、Gong Yungo、加藤靖文、佐治久、垣花昌俊、臼田実男、梶原直央、内田修、野村将春、前田雅弘、平野隆、池田徳彦、短期培養後の培養上清を用いた早期発見を目指した肺腺癌バイオマーカー探索、第 5 回日本臨床プロテオーム研究会. 京王プラザホテル 2009 年 5 月 9 日
 10. 福田哲也、比毛浩、藤井清永、濱崎裕子、西山隆太郎、板東泰彦、野村将春、加藤治文、西村俊秀 MRM 定量質量分析のための新規エレクトロスプレー・インターフェースの開発：大細胞神経内分泌系癌を区別できる新規マーカーの同定・検証を適応例として 第 57 回質量分析総合討論会、2009 年 5 月
 11. 西村俊秀、野村将春、福田哲也、藤井清永、川村猛、濱崎裕子、比毛浩、木原誠、板東泰彦、池田徳彦、加藤治文 新規選択的定量分析手法に基づく肺癌ホルマリン固定組織切片を用いた癌タイプ（大細胞癌、小細胞癌、大細胞神経内分泌系癌）識別マーカーの同定 第 32 回日本分子生物学年会（The 32nd Annual Meeting on the Molecular Biology Society of Japan, 2009）、2009 年 12 月
 12. Masaharu Nomura, Toshihide Nishimura, Tatsuo Ohira, Hiromasa Tojo, Shinobu Nonomura, Hiroko Endo, Yasuhiko Bando, Kiyonaga Fujii, Norihiko Ikeda, Adi F. Gazdar. A cell line from LCNEC of the lung and its genetic and proteomic analysis. AACR 100th Annual Meeting 2009, April 18-22, Denver, Colorado, USA.
 13. Tatsuo Ohira, Jitsuo Usuda, Shynji Ichinose, Sachio Maehara, Yuka Kuwajima, Hisashi Saji, Masatoshi Kakihana, Masaharu Nomura, Naohiro Kajiwara, Osamu Uchida, Takashi Hirano, Norihiko Ikeda. MicroRNA profiles of lung cancer patients using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. AACR 100th Annual Meeting 2009, April 18-22, Denver, Colorado, USA.
 14. Hisashi Saji, Masahiro Tsuboi, Jitsuo Usuda, Masaharu Nomura, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda. A gene expression signature predicts prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. AACR 100th Annual Meeting 2009, April 18-22, Denver, Colorado, USA.
 15. Nomura Masaharu, Nishimura Toshihide, Bando Yasuhiko, Fukuda Tetsuya, Fujii Kiyonaga, Nishiyama Ryutarō, Hamasaki Hiroko, Hike Hiroshi, Tsuboi Masahiro, Ohira Tatsuo, Kato Harubumi, Ikeda Norihiko. Novel characteristic proteins of LCNEC, LC and SCLC detected from formalin fixed paraffin embedded tissues. 13th World Conference of Lung Cancer, July 31-August 4, 2009. San Francisco, CA. USA.
 16. Ohira Tatsuo, Oikawa Takeshi, Kuwajima Yuka, Maehara Sachio, Ichinose Shuji, Kakihana Masatoshi, Usuda Jitsuo, Nomura Masaharu, Kajiwara Naohiro, Uchida Osamu, Hirano Takashi, Ikeda Norihiko. Biomarker analysis by microRNA profiles of lung cancer patients in Formalin-fixed tissue. 13th World Conference of Lung Cancer, July 31-August 4, 2009. San Francisco, CA. USA.
 17. Kato Yasufumi, Matsubayashi Jun, Kuwajima Yuka, Kakihana Masatoshi, Usuda Jitsuo, Kajiwara Naohiro, Uchida Osamu, Hirano Takashi, Nomura Masaharu, Ohira Tatsuo, Ikeda Norihiko. GLUT-1: A useful marker for the diagnosis of malignant mesothelioma from pleural effusion. 13th World Conference of Lung Cancer, July 31-August 4, 2009. San Francisco, CA. USA.
 18. Toshihide Nishimura, Testuya Fukuda, Hiroshi Hike, Kiyonaga Fujii, Hiroko Hamasaki, Masaharu Nonmura, Ysuhiko Bando, Norihiko Ikeda, Harubumi Kato A Novel Closed ESI Interface Improved