

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～21年度 総合研究報告書

研究代表者 後藤 典子
平成22(2010)年 5月

別紙2

目 次

- I. 総合研究報告
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

後藤 典子

----- 2

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。正常肺腺細胞を用いた 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

平野 隆 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 准教授 (平成19、20年度)

野村 将春 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 講師 (平成21年度)

西村 俊秀 東京医科大学 呼吸器甲状腺外科 客員教授 (平成21年度)

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に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。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、野村、西村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(年度ごとに記載)

平成21年度

1.肺癌予後予測シグネチャーの評価と解析

宮野らの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、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癌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、本邦肺癌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肺癌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. 肺癌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

(1) I・II期肺癌手術組織におけるEGFR・KRAS遺伝子の体細胞変異を同定する。

(2) EGFR、KRAS癌遺伝子変異情報の得られた肺癌手術検体より、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。

4. バイオインフォマティクス技術開発

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。

5. 乳癌幹細胞の研究

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の活性化を起し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、乳癌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、癌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. 肺癌のプロテオミクス解析

(1) FFPE組織切片を用いたプロテオーム解析

(2) (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 Tissue™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。

7. 機能性 RNA(ncRNA) の研究

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) を選出し、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。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 やウェスタンブロットングにて EGFR の発現を検討する。

平成 20 年度

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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究

(1)-1 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。

(1)-2 肺腺癌手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

本研究への肺癌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癌センター中央病院手術摘出標本より、肺線がん 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) プロテオーム解析

(2)-1 肺癌臨床検体を用いたマイクロアレイ法 (MAC Array 法) により解析

病理学的診断に影響を及ぼさない腫瘍部分を凍結標本とし、残りをホルマリン固定する。DNA (遺伝子) や、その産物である RNA や蛋白質を抽出する。DNA の抽出後 MAC アレイにて遺伝子異常のパターンを検証する。マイクロアレイでは、ハイブリダイゼーションの工程は、結果を大きく左右するため。MAUI ハイブリダイゼーションシステムを用いてハイブリダイゼーションを行う。完成したスライドは、DNA マイクロアレイキャナー (GenePix) を用いて読み取り、専用のコンピュータソフトを用いて詳細な検討を行う。

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をそれぞれ MAC アレイにて測定し、それぞれの発癌に関与している遺伝子異常の違いを検討する。

MAC Array 実験の流れ

癌組織からの DNA 採取 : THE PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra 社)

↓

Cy3-dCTP, Cy5-dCTP (Amersham Biosciences 社) で Sample DNA と Reference DNA (Human Genomic DNA: Promega 社) をラベリング (必要 DNA 量 $1\mu\text{g} \sim 2\mu\text{g}$)

↓

ラベリングされた DNA の精製 : BioPrime

Array CGH Genomic Labeling System
(Invitrogen 社)

↓
ハイブリダイゼーション：MACArray Karyo
4000 および MAC Array Universal Kit Reagent
Components for MAC Array Karyo 4000
(Macrogen 社)

↓
Washing

↓
スキャニング：Gene Pix 4100A (インターメ
ディカル社)

↓
分析

(2)-2 肺腺癌培養細胞 PC9 のチロシンキナーゼ阻害薬によるリン酸化蛋白質の発現変化

PC9 肺腺癌培養細胞株は exon 19 の欠損株であり、チロシンキナーゼ阻害剤の感受性が非常に高いことが知られている。PC9 肺腺癌培養細胞株を gefitinib 処理・EGF 刺激し、発現するリン酸化蛋白質の変化を以下の 2 つの方法で検出することを試みた。

- ① gefitinib 処理の有無によりえられた 2 サンプルに異なる蛍光色素で 標識後、2 サンプルを混合し同一ゲル上で解析し 2 サンプル間の蛋白質発現量の比較を容易にした ETTAN-DIGE 法による解析。
- ② 2 次元電気泳動法後に Western blotting を施行、チロシンリン酸化含有蛋白質を認識する抗体で検出される蛋白質スポットを検出する方法で、gefitinib 処理により検出されなくなる蛋白質スポットの解析。
以上の 2 通りの解析で検出された 2 次元電気泳動ゲル上のスポットは切り出され、質量分析法によって蛋白質分子の同定を試みた。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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、新規バイオマ

ーカー並びに新規分子標的の抽出を行う。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌細胞株における CD133、CD24、CD44 表面抗原分子の発現解析

13 例の肺癌細胞株 (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。

河野の項に記述。

3. 機能性 RNA(ncRNA)の解析

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 PPARgamma の標的となる miRNA を単離した。

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

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。

平成 19 年度

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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究
(1)-1 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。

・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。

(1)-2 肺癌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 例のヒト肺癌細胞株よりゲノム 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) プロテオーム解析及びゲノム解析

(2)-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)-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。

(2)-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、各群間の発癌に参与している遺伝子異常の違いを検討する。

(3) HER シグナル抑制分子の臨床検体を用いた評価乳癌組織において、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 EGF family の他の分子の発現との相関を検討した。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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、新規バイオマーカー並びに新規分子標的の抽出を行う。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索 75 例のヒト肺癌細胞株より得た 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。

3. 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

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)

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。

B. 研究結果 (年度ごとに記載)

平成21年度

1. 肺腺癌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 は肺腺癌 58 症例、扁平上皮癌 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癌においては 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 の扁平上皮癌症例と肺腺癌症例 mix の状態で 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)

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) イレッサ耐性肺癌細胞株 PC9ZD のイレッサ耐性分子機構の解析

イレッサ感受性肺癌細胞株 PC9 とイレッサ耐性肺癌細胞株 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、その後宮野らが開発した MetaGP 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。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。肺癌においては 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癌における分子機構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の関連を調べる為に 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を発現している肺癌細胞においてもみられるのかどうか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相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. 肺腺癌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

(1) 肺腺癌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癌センター中央病院手術摘出標本より、肺線癌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。

4. バイオインフォマティクス技術開発

(1) 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。

(2) 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。

5. 乳癌幹細胞の研究

MCF7細胞株のCD24^{-low}CD44⁺乳癌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⁺乳癌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⁺乳癌幹細胞画分ではIL8、CCL5の発現低下が認められた。

乳癌幹細胞スフェア培養モデルを確立した。具体的には8種類のヒト乳癌細胞株(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- κ B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なっても、やはりスフェアの形成効率は低いままであった。

6. 肺がんのプロテオミクス解析

(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。

7. 機能性RNA(ncRNA)の研究

(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96well 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トングを用いて、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。

平成20年度

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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究

(1)-1 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。化学療法の選択は副作用と効果の期待が再発率に対応する為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。

a. 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 で刺激することでこれらの経路を包括的に活性化出来ているのではないか？

b. 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び出し、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。

(1)-2 肺腺癌手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

肺線癌 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) プロテオーム解析

(2)-IMAC Array 法による肺癌遺伝子解析

喫煙者に特異的な発現低下は、染色体 7,9,11 や 18 などに認められた。一方で、喫煙者に特異的な発現

増加は、染色体 3,5,15,18 および 20 に認められた。

(2)-2 肺腺癌培養細胞 PC9 のチロシンキナーゼ阻害薬によるリン酸化蛋白質の発現変化

ETTAN-DIGE 法による解析で gefitinib 処理により発現低下する 2 次元電気泳動ゲル上の 11 スポットを検出したことは昨年報告した。さらに抗チロシンリン酸化含有蛋白質抗体を用いた Western blotting 法では gefitinib 処理によりチロシンリン酸化蛋白質が発現低下した 21 スポットを検出した。

両方の解析で共通して発現低下が認められたスポットを質量分析法で解析し、Ezrin, Lamin A/C を同定した。さらに抗チロシンリン酸化含有蛋白質抗体による Western blotting 法の解析結果に基づき発現が減少するとして検出されたスポットの質量分析法による解析では Radixin, Moesin 分子も同定された。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌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癌細胞株で検出された。そこで、13 例の肺癌細胞株 (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 分子の発現と肺癌組織型・遺伝子異常との関連はみられなかった。

3. 機能性 RNA(ncRNA)の解析

Pearson's correlation によって、PPAR γ 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) がい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。

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

文献情報から EGFR パスウェイのシミュレーションモデルを Cell Illustrator を用いて構築した。この基本モデルに基づき、Gefitinib を投与した場合のパスウェイモデルを統合し、EGF 刺激と Gefitinib 刺激を組み合わせた SAEC の細胞に対する、文献に基づくゴールドスタンダードモデルをほぼ完成した。さらに EGF 刺激及びイレッサ処理後の時系列遺伝子発現データ対して、統計的時系列モデルである状態空間モデルを用いて、異なる細胞株間や、薬剤投与条件に差のある細胞間の遺伝子制御シス

テムの差異に関わる遺伝子群を、モデルからの予測と、観測結果の差異から抽出する方式を構築し、SAEC に EGF を投与した場合と、EGF および Gefitinib を投与した場合の時系列マイクロアレイデータに適用することにより、薬剤投与により制御関係に変異が生じた遺伝子群を抽出した。

平成19年度

1. HER ファミリー分子の異常に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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究
(1)-1 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までの情報をエントリーした。

(1)-2 肺癌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

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 を発現する肺癌由来細胞株 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) プロテオーム解析及びゲノム解析

(2)-1 腺癌 69 症例中 31 例 (44.9%) ; 非腺癌 83 例中 6 例 (7.2%) に EGRF 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)-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。

(2)-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。

(3) HER シグナル抑制分子の臨床検体を用いた評価

乳癌切片において、癌組織特異的に FRS2β 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。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌幹細胞の分離のためのマーカー遺伝子の探索

75 例のヒト肺癌細胞株より得た 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。

3. 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

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 (年度ごとに記載)

平成 21 年度

1. 肺腺癌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癌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、肺癌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) イレッサ耐性肺癌細胞株 PC9ZD のイレッサ耐性分子機構の解析

肺腺癌イレッサ耐性の新たな分子機構として、癌遺伝子中毒に陥った癌が、EGF シグナル依存から N-cadherin 依存へと変化する場面があることを見いだした。N-cadherin は、イレッサ耐性癌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. 肺腺癌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

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、本邦の肺腺癌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 期の肺腺癌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、肺癌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、喫煙や発癌経路による特異性・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、難治がんである肺癌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。

4. バイオインフォマティクス技術開発

項目1、2に記載。

5. 乳癌幹細胞の研究

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。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. 肺癌のプロテオミクス解析

(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。

7. 機能性RNA(ncRNA)の研究

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。

平成20年度

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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究
(1)-1 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。

(1)-2 肺腺癌手術摘出標本からの核酸調整及び診療情報の収集

肺腺癌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、同定された肺癌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) プロテオーム解析

(2)-1 非喫煙者に特異的な発癌過程が存在し、非喫煙者と喫煙者間では、異なる遺伝子発現パターンが存在することが示唆された。

(2)-2 EzrinおよびRadixin, Moesinは非常に構造が類

似した細胞膜とアクチンフィラメントを架橋する蛋白質群 (ERM Actin-binding proteins) として知られている。微 絨毛や細胞接着部位に局在し、細胞の増殖・分化・運動能・細胞間接着などの機能に関わる蛋白質と考えられている。がん細胞では浸潤や転移の引き金となる上皮間葉転換と関わり、癌の進展に関与することが示唆されている蛋白質群である。Ezrin は A431 細胞を EGF 刺激することで 146 番目と 354 番目のチロシン残基のリン酸化 が 亢進することが知られているが、EGFR の変異を有する肺腺癌細胞を用い、チロシンキナーゼ阻害剤処理でリン酸化 Ezrin の脱リン酸化の亢進を示したのは知りえた限りでは本報告が初めてと考えている。また、lamin A/C は核膜の裏打ち蛋白質であり、中間径フィラメントに属する。核の形や大きさを決め、核クロマチンとの結合など重要な機能が推測されているが、その機能の詳細は分かっていない。Lamin A/C をコードする遺伝子 (LMNA) の異常はその異常部位によって、骨格筋・心筋・脂肪細胞などの「細胞死」を特徴とした多彩な臨床症状が引き起こすことが知られている (Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー症など)。この様な蛋白質群のチロシンキナーゼ阻害薬による脱リン酸化の亢進はその抗腫瘍効果・副作用における作用機序と関わっていることが強く推測される。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌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、脳腫瘍や肺癌における癌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、乳癌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、癌幹細胞特性との関連を明らかにする予定である。

3. 機能性 RNA(ncRNA)の解析

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

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

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実証された。

平成 19 年度

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

(1) トランスクリプトーム解析を軸とする研究

(1)-1 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。

(1)-2 肺癌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

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) プロテオーム解析及びゲノム解析

(2)-1 腺癌における EGFR 遺伝子変異の割合に日本人・中国人間に大きな違いは認められなかった。

(2)-2 今後再現性を確認後、質量分析による蛋白質分子の同定を予定している。チロシンキナーゼ阻害薬のリン酸化経路に与える影響と臨床上的治療効果の関連を検討していきたい。

(2)-3 近年、肺癌では喫煙をしない女性に腺癌が多くみられるようになってきた。非喫煙者には、今までの発癌過程と異なるメカニズムが存在するが示唆された。

(3) HER シグナル抑制分子の臨床検体を用いた評価

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。

2. 癌幹細胞による癌化パスウェイの解析

(1) 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。

(2) 肺癌幹細胞の解析

肺癌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、肺癌の組織型

により幹細胞マーカーが異なること、つまり、異なる細胞が癌幹細胞であることを示している。よって、肺癌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癌細胞を分画し、ヌードマウスにおける腫瘍原性等を調べることににより、肺癌幹細胞を同定して行く予定である。

3. 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

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

総括

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。

以下年度ごとに記載

平成20年度

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。

平成19年度

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

後藤 典子

- 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.

- 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.: FRS2a^{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*, 1819-1823, July 4, 2008.
- 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.
- 河野 隆志
- 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 human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 30: 1199-1206, 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

黒田 雅彦

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.

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.

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]

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.

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.

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.)

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.

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.

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)

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