

# 「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した 創薬基盤技術開発」

## 事業原簿【公開版】

担当部	独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 バイオテクノロジー・医療技術部
-----	--

## 目次

概 要.....	2
プロジェクト用語集.....	6
I. 事業の位置付け・必要性について.....	8
1. 事業の背景・目的・位置付け.....	8
2. NEDOの関与の必要性・制度への適合性.....	9
2.1. NEDOが関与することの意義.....	9
2.2. 実施の効果.....	9
II. 研究開発マネジメントについて.....	10
1. 事業の目標.....	10
2. 事業の計画内容.....	11
2.1. 研究開発の内容.....	11
2.2. 研究開発の実施体制.....	19
2.3. 研究開発の運営管理.....	20
2.4. 研究開発成果に係る知財マネジメント.....	21
3. 情勢変化への対応.....	21
4. 評価に関する事項.....	21
III. 研究開発成果について.....	22
1. 事業全体の成果.....	22
2. 研究開発項目毎の成果.....	24
研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」.....	24
研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」.....	41
研究開発項目③「探索的実証研究」.....	56
研究開発項目④「総合調査研究」.....	63
IV. 実用化の見通しについて.....	65
1. 実用化の見通し.....	65
添付資料.....	66
健康安心イノベーションプログラム基本計画.....	67
プロジェクト基本計画.....	81
平成 24 年度実施方針.....	90
事前評価関連資料.....	99
特許・論文・学会発表リスト.....	104

概要

最終更新日 平成 24 年 6 月 29 日

プログラム（又は施策）名	健康安心イノベーションプログラム					
プロジェクト名	後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発	プロジェクト番号	P10005			
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部/主査 菅原 武雄（平成 24 年 4 月～） バイオテクノロジー・医療技術部/主査 宮川 知也（平成 22 年 10 月～平成 24 年 3 月）					
事業の概要	<p>後天的ゲノム修飾（エピゲノム修飾）を標的とした、癌の診断及び治療法開発のための基盤技術の開発を行う。特に、後天的ゲノム修飾の中心であるヒストン修飾の制御に重要な機能を持つ、メチル化・脱メチル化酵素ファミリーの中より創薬標的分子を同定し、構築した基盤技術の有用性、妥当性を検証する。</p> <p>これらの研究開発は、先進的なエピゲノム修飾解析技術および質量分析技術を有する東京大学先端科学技術研究センターを集中研とするオープンラボを中核に、医療機関および製薬・診断企業が構成する技術研究組合が参加する研究体制によって推進する。</p>					
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>1. 事業の位置付け 近年のメカニズムベースの創薬戦略においては標的同定が創薬の成否を握る。ヒストンメチル化、脱メチル化をはじめとする後天的ゲノム修飾情報を制御する数百に及ぶ修飾因子群は、「有望な創薬標的」と考えられる。本事業では、我が国の 21 世紀医薬品産業の飛躍の上で鍵となるエピゲノム創薬を世界に先駆けて推進するために、DNA、RNA、タンパク質、情報処理研究者が結集し、基礎・臨床・産業が一体となった研究体制の下に、先進的エピゲノム解析をコアとする創薬イノベーション基盤を確立する。</p> <p>2. 事業の必要性 エピゲノム情報と疾患との関連は未だほとんど解明されておらず、必要となる臨床情報の付随した検体の入手も困難であるため、現時点では企業が個別に参入するにはハードルが高い。さらに、個別企業が先進的解析拠点を立ち上げることは、専門的人材の育成およびエピゲノム解析のための先進的技術導入に時間を要し、自社内で推進するには莫大な投資が必要となるため、リスクが高い。企業、研究者及び臨床家の連携の下に、一体的なプラットフォームとして世界トップレベルの産学連携体制をアカデミアに集中研として構築し、技術・情報基盤を確立することにより基礎研究成果を迅速に実用化に展開することは、我が国の医薬品産業において急務である。</p>					
II. 研究開発マネジメントについて						
事業の目標	後天的ゲノム修飾を制御する薬剤開発を推進するための基盤を構築するとともに、本研究事業の成果として 5 つ以上の創薬・診断標的分子を同定し、構築した創薬基盤の妥当性を実証する。					
事業の計画内容	研究開発項目	H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	H26fy
	① 後天的ゲノム修飾解析技術開発	←				→
	② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発	←				→
	③ 探索的実証研究	←				→
	④ 総合調査研究	←				→

開発予算 (百万円)	会計・勘定		H22fy	H23fy	H24fy	総額	
	一般会計		273	265	484	1,022	
	加速予算 (成果普及費を含む)		0	180	0	180	
	総予算額		273	445	484	1,202	
	(契約種類)	(委託)	○	273	445	484	1,202
		(助成) : 助成率△/□		—	—	—	—
		(共同研究) : 負担率△/□		—	—	—	—
		経産省担当原課	製造産業局生物化学産業課				
		プロジェクトリーダー	東京大学先端科学技術研究センター 教授 油谷 浩幸				
		サブリーダー	研究開発項目 ①	東京大学先端科学技術研究センター 助教 永江 玄太			
	研究開発項目 ②		東京大学医学研究科 准教授 石川 俊平				
	研究開発項目 ③		東京大学先端科学技術研究センター 特任助教 川村 猛				
	委託先	<p>○エピゲノム技術研究組合 (7社) (株) 未来創薬研究所、協和発酵キリン (株)、興和 (株)、シスメックス (株)、(一社) バイオ産業情報化コンソーシアム、(独) 産業技術総合研究所、(公財) がん研究会</p> <p>※共同実施先 (2社) (独) 理化学研究所、大阪大学</p> <p>○東京大学 先端科学技術研究センター、医学部付属病院、大学院医学系研究科、分子細胞生物学研究所</p>					
情勢変化への対応	<p>平成 23 年 8 月に加速資金 180 百万円を投入した。</p> <p>平成 22 年 10 月に開始した本プロジェクトにおいては、解析に使用するシーケンサーや質量分析計はいずれも数年以上前に購入したものであり、機器の老朽化とともに、最新機器と比較してサンプル処理速度や感度の低さが課題となっていた。</p> <p>一方で国外の動向を見ると、米国の国立衛生研究所 (NIH)、欧州の第 7 次研究枠組み計画 (FP7) では、後天的ゲノムプロジェクトに次世代シーケンサーや最新式の質量分析装置などを数十～数百台規模で導入しており、国外の研究成果創出スピードに大きく遅れをとりつつあるのが現状である。</p> <p>本加速資金投入により、後天的ゲノム修飾解析の大幅な効率化を図るとともに、後天的ゲノム修飾組合せ解析感度が飛躍的に向上した。この結果、新規創薬・診断標的の探索と同定が加速された。</p>						

評価に関する事項	事前評価	平成 22 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部
	中間評価	平成 24 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術部
	事後評価	平成 27 年度実施予定
Ⅲ. 研究開発成果について	<p>● 事業全体</p> <p>エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンが前癌病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。また、数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて、高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見いだした。さらに、標的タンパク質 5 分子についてアッセイ系を確立した。</p> <p>○ 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」</p> <p>数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援した。クロマチン解析の感度を 10 倍以上向上させ、特異性の高い抗体開発も推進した。全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを実施すると共に、DNA 脱メチル化に関わるヒドロキシメチルシトシンの局在解析系を確立した。高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類のヒストン修飾組み合わせパターン検出を可能とした。</p> <p>○ 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」</p> <p>アーカイブを用いた組織アレイによる迅速解析手法を構築した。創薬研究に繰り返し利用可能な腫瘍組織試料としてゼノグラフトの系統的樹立を行った。スクリーニングマーカーとして DNA メチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。数千に及ぶ ncRNA を RNA-seq およびエクソンアレイによって検討し、腫瘍組織で発現増加し、細胞増殖を亢進させる ncRNA を同定した。新たに創薬標的候補として 7 分子を同定した。</p> <p>○ 研究開発項目③「探索的実証研究」</p> <p>当初、実証的探索研究としてかかげた 4 標的分子を含めて合計 11 分子の機能解析が現時点で進行中である。そのうち 5 分子の標的分子としての妥当性を検証するために、3 分子については <i>in silico</i> 手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、1 分子については従来型のハイスループットスクリーニング、3 分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索している。</p> <p>○ 研究開発項目④「総合調査研究」</p> <p>次世代シーケンサー、質量分析装置の開発動向とエピゲノム研究における活用に関して調査を行った。</p>	
	投稿論文	「査読付き」53 件
	特許	「出願済」1 件、「登録」0 件、「実施」0 件（うち国際出願 0 件）
	学会発表	71 件
	Ⅳ. 実用化の見通しについて	<p>DNA メチル化異常は前癌病変を含む発がんプロセス早期において既に確立されることが多く、がんのスクリーニングのマーカーとして好適である。測定対象は脱落したがん細胞から血液中に放出された流血中のゲノム DNA であり、早期診断への活用が期待される。多くの癌腫でメチル化異常を示す領域がある一方で、癌種によって選択的にメチル化される遺伝子があることから、一次スクリーニングおよび臓器別のスクリーニングにも有効である可能性が期待される。既に多数のがん選択的な DNA メチル化マーカーを抽出し、一部は特許出願も終えている。臨床血液検体を用いた検証、既存のメチル化マーカーとの性能比較も開始している。</p> <p>メチル化関連酵素は分子ファミリー自体が比較的近年同定されたことに加えて多様であることから、優先的に阻害剤開発を進めるべく、アッセイ系を構築し、参加企業での独自化合物ライブラリースクリーニングへの展開を予定している。立体構造が決定されている分子についてはインシリコでの化合物デザインから結合化合物をスクリーニングし、加速化をはかる一方、独自に立体構造決定を進め、標的分子からリ</p>

	ード化合物同定までのプロセス短縮を目指している。	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成 22 年 3 月作成
	変更履歴	該当なし。

## プロジェクト用語集

用語	解説
BIACORE	表面プラズモン共鳴を利用し分子間相互作用を解析するシステム及びその製作・販売会社。ラベルフリーの微量サンプルでの測定が可能である。
CpG アイランド	シトシンの次にグアニンが現れるタイプの 2 塩基配列（ジヌクレオチド）である CpG サイトの出現頻度が、ゲノム中で他と比べ高い領域で、遺伝子のプロモーター領域に多く見られる。
ChIP-seq 法	クロマチン免疫沈降した DNA 断片を次世代シーケンサーで読み取り、ヒストン修飾や蛋白結合部位などのエピゲノム標識を読み取る方法。
CID	Collision induced dissociation（衝突誘起解離）。質量分析計での MS/MS でのフラグメンテーション法の一つであり、コリジョンセル内で目的イオンにガスを衝突させることで断片化する。
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（酵素結合免疫吸着法）。試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する方法。抗体のタイターチェックにも用いられる。
ETD	Electron transfer dissociation（電子移動解離）。質量分析計での MS/MS でのフラグメンテーション法の一つであり電子供与体と目的イオンを反応させることで断片化する手法
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching の略で、光褪色後蛍光回復を観察することで生体分子の動きやすさを生きた細胞で測定する方法。
<i>in vitro</i> スクリーニング	化合物スクリーニングで精製酵素と基質を用いて細胞・生体ではなく試験管内（反応プレート上）で実験をおこなう手法。
<i>in silico</i> 化合物スクリーニング	化合物スクリーニングで、実験により阻害・結合を確認するのではなくコンピューターシミュレーションによる計算科学でスクリーニングをする手法。
IVT 法	In vitro Transcription の略で、試験管内で RNA 転写反応を行うことで鋳型 DNA のリニア増幅を行う方法。
LC/MS	液体クロマトグラフィー（liquid chromatography : LC）と接続した質量分析計（mass spectrometr : MS）による解析手法。
MALDI-TOF/MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometr（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）。イオン化のためのマトリックスと試料を混合した物をプレート上に載せレーザーでイオン化し真空中の飛行時間を測定する手法の質量分析計。
MBD カラム	メチル化 DNA 結合蛋白の結合ドメインを用いてメチル化シトシンを吸着するカラム。
MS/MS スペクトル	質量分析計で測定したイオン（プレカーサーイオン）を選択し、そのイオンを解裂させることで得られるフラグメントイオンのスペクトル。
PR ドメイン	PRDI-BF1 and RIZ 相同ドメイン。ヒストンリジンメチル化活性ドメインとして知られている。SETドメインと類似した構造をとる。
RIP-seq 法	タンパクと結合している RNA を免疫沈降し、シーケンシングによって同定する方法。
SET ドメイン	ショウジョウバエ Su(var)3-9, E(z), Trithorax 遺伝子産物が共有するドメイン。ヒストンリジンメチル化活性ドメインとして知られている。PR ドメインを含め、ヒトゲノム中には約 50 の SET ドメインタンパク質がコードされている。
shRNA	Short hairpin RNA。6-10 塩基程度のヘアピン領域を挟み、両側に 20-25 塩基程度の互いに相補的な配列を含む RNA。相補部分は 2 本鎖を形成し、相同配列をもつ遺伝子の発現を抑制する。
siRNA	Small interfering RNA の略。20-25 塩基程度の 2 本鎖 RNA。相同配列をもつ遺伝子の発現を抑制する。
SRM	Selected reaction monitoring（選択反応モニタリング）。MRM（Multiple reaction monitoring）とも呼ばれる。三連四重極型質量分析計での測定法で特定のイオンを解裂させて得られる 2 次イオンを測定することでノイズが少なく高感度で定量する手法。

用語	解説
Tet システム	大腸菌 Tet リプレッサータンパク質及び Tet オペレーターDNA 配列を利用した遺伝子発現制御システム。テトラサイクリンもしくはドキシサイクリン依存的にリプレッサーの DNA 結合能を調節することにより、オペレーター下流に連結した遺伝子の発現を制御できる。
UCSC Genome Browser	カリフォルニア大学サンタクルーズ校が開発している、ゲノム、エピゲノム情報の標準的ブラウザ。
Xenograft (ゼノグラフト)	ヒト癌組織を免疫不全マウスの皮下に移植したもので、癌治療法の抗腫瘍活性評価に用いられる。
ウェスタンブロット	電気泳動により分離したタンパク質を膜に転写し、抗体を用いて目的のタンパク質・タンパク質修飾を検出する方法。
エクソンアレイ	個々のエクソン毎にプローブが設計されたアレイで、選択的スプライシングなどの検出に用いられる。
エピジェノタイピングアレイ	バイサルファイト処理後の DNA をタイピングすることによって CpG メチル化の有無を半定量的に計測できるマイクロアレイ。
隠れマルコフモデル	マルコフ性とは、未来の挙動が現在の値だけで決定され、過去の挙動と無関係であるという性質であり、観測可能な情報からその未知のパラメータを推定する確率モデルの一つ。
キメラ遺伝子	2つの異なる遺伝子の一部が融合した遺伝子で、腫瘍では「染色体転座」により癌遺伝子が活性化される。
クロマチン	真核細胞内に存在する DNA とタンパク質の複合体。ヒストンタンパク質に DNA が巻きついたヌクレオソーム構造を基本単位とする。
クロマチン免疫沈降	部分的に破壊・分解したクロマチンに含まれるタンパク質を、DNA と結合した状態のまま抗体を用いて分離する方法。一般的に沈降された画分中の DNA を解析するために利用される。
ゲノムインプリンティング	遺伝子刷り込みと呼ばれ、片方の親から受け継いだ遺伝子のみが発現する現象。DNA メチル化がその制御に関与する。
後天的ゲノム修飾	ゲノム配列には変化がなく、DNA メチル化、ヒストンアセチル化やメチル化などクロマチン上に後天的に加わる化学修飾で、遺伝子発現の制御に重要な役割を担う。
バイサルファイト	亜硫酸水素塩。本試薬で DNA を処理するとシトシン塩基はウラシルに置換されるが、メチル化シトシンは本反応から保護され塩基置換が起きない。
ナノポアシーケンシング	次世代シーケンシング技術の一つであり、チャンネル分子やグラフェンなどの細孔（ナノポア）に DNA などの生体分子を通過させて配列を決定する方法。
ヒドロキシメチルシトシン	Tet タンパク質ファミリーのメチル化シトシンヒドロキシラーゼ活性に依存して生成され、DNA 脱メチル化反応の中間産物として注目されている。
バキュロウイルス	2 本鎖 DNA をゲノムにもち、節足動物に感染するウイルス。脊椎動物には感染・増殖しない。生命科学分野ではベクターとして用いられ、昆虫細胞でのタンパク質発現に利用される。
非コード RNA	タンパク質へ翻訳されない non-coding RNA のことであり、近年のトランスクリプトーム、エピゲノム研究からゲノム中に数千個あることが判明した。長鎖 ncRNA はクロマチン機能の制御への役割が注目されている。
ヒストン修飾	ヒストンタンパク質の翻訳後修飾。ヒストンの C 末端領域は球状構造、N 末端領域は直鎖状構造をとり、この N 末端のヒストンテールと呼ばれる領域はメチル化、アセチル化、リン酸化をはじめとする様々な翻訳後修飾を受けるアミノ酸残基が集中して存在する。転写制御をはじめとする様々なクロマチンを介した現象を司っている。
ペプチドライブラリー	多様なもしくはランダムなアミノ配列をもつペプチド分子の集団。主に目的の性質をもつペプチドをスクリーニングする際に用いられる。
マイクロアレイ	DNA やペプチドなどを多数（たとえば千個以上）固定化しておき、これに対して一度に検査・実験を行う技術。遺伝子発現や SNP を網羅的に測定する際に用いられる。
メチル化 DNA 免疫沈降法	メチル化シトシンに対する特異的抗体を用いてメチル化された DNA を回収する手法。

## 1. 事業の位置付け・必要性について

### 1. 事業の背景・目的・位置付け

創薬における研究開発費は増加の一途をたどり、1品目あたり500億円を超える一方で、新薬上市件数は低下するという世界的傾向の中、創薬研究の効率を上げ、研究開発リスクを低減させることが喫緊の課題となっている。近年のメカニズムベースの創薬戦略においては、標的同定が創薬の成否を握っており、副作用が少なく効果の高い医薬品開発のために、ゲノム情報を活用した創薬研究が主流となっている。医薬産業政策研究所「製薬産業の将来像」においても、創薬プロセスにおけるボトルネックの一つとして、疾患標的分子の同定が挙げられている。

近年、後天的ゲノム修飾（エピゲノム修飾）、すなわちDNAやヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化等は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが相次いで明らかとなってきた。さらに、ギガシーケンサー、高精度質量分析装置等の出現によるエピゲノム解析技術の急速な進展により、エピゲノム修飾の制御に関与しているとされるタンパク質は数百以上にのぼることが明らかとなっている。したがって、後天的ゲノム修飾の網羅的な解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。技術戦略マップ2009（平成21年4月経済産業省策定）においても、後天的ゲノム修飾の解析は、波及効果が高く、「画期的な医薬品の開発」、「医薬品開発の効率化」に資する重要技術として位置付けられている。

しかし、後天的ゲノム修飾研究は緒に就いたばかりの世界最先端の分野であり、研究に必要な臨床情報の付随した検体の入手も困難であるため、後天的ゲノム修飾情報と疾患との関連は未だ十分に解明されているとは言えない。また、高度な解析技術や情報処理技術等、後天的ゲノム修飾解析のための先進的技術導入や専門的人材の育成等には多大な時間と投資が必要であるため、民間企業等が独自に研究を進めるにはリスクが高い。

米国では、後天的ゲノム修飾研究を国立衛生研究所（NIH）のロードマップの一つに位置づけ、2008年より7年間で総額2億ドルを超えるプロジェクトを開始しており、欧州でも第6次研究枠組み計画（FP6）に引き続き、2010年より第7次研究枠組み計画（FP7）の中で後天的ゲノム修飾研究を展開している。

我が国においても、すでに大学・研究機関を中心に世界に先駆けて後天的ゲノム修飾研究に着手していたが、基礎研究成果を実用化に展開するためには、さらに基礎・臨床・産業が一体となって創薬研究基盤を構築する必要がある。

さらに、2009年に政府が閣議決定した「新成長戦略」を受け、総合科学技術会議が2010年に打ち出した「科学・技術重要施策アクション・プラン」において、「ライフ・イノベーション」の重点的取り組み項目「がんの早期診断・治療技術の研究開発」の中の施策として、「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」が取り上げられている。

本事業では、疾患の原因となる後天的ゲノム修飾の効果的・効率的解析手法の開発を行い、後天的ゲノム修飾を高感度で検出するシステムを構築するとともに、複数種類の癌との関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発する。さらに、後天的ゲノム修飾に起因する複数種類の癌に対し、後天的ゲノム修飾を制御する分子等を用いた探索的実証研究を通じて、基盤技術としての有用性を検証する。

プロジェクト期間中に最先端の技術を学から民へ移転するとともに、創薬ターゲットとなり得る後天的ゲノム修飾が解析されれば、企業による医薬品開発の効率化が期待できる。さらに将来、個人の後天的ゲノム修飾情報に基づくオーダーメイド治療が実現されれば、国民の健康維持・増進や医薬品産業等のイノベーション、医療財政の負担軽減、我が国の国際競争力強化に大きく寄与する

ことが期待できる。

## **2. NEDO の関与の必要性・制度への適合性**

### **2.1. NEDO が関与することの意義**

近年のメカニズムベースの創薬戦略においては標的同定が創薬の成否を握る。ヒストンメチル化、脱メチル化をはじめとする後天的ゲノム修飾情報を制御する数百に及ぶ修飾因子群は、「有望な創薬標的」であると考えられる。

一方で、後天的ゲノム修飾情報と疾患との関連は未だほとんど解明されておらず、必要となる臨床情報の付随した検体の入手も困難であるため、現時点では企業が個別に参入するにはハードルが高い。さらに、個別企業が先進的解析拠点を立ち上げることは、専門的人材の育成およびエピゲノム解析のための先進的技術導入に時間を要し、自社内で推進するには莫大な投資が必要となるため、リスクが高い。

したがって、企業、研究者及び臨床家の連携の下に、一体的なオープンイノベーションを可能にする産学連携体制を構築し、創薬のための新たな技術・情報基盤を早急に確立する必要がある。そのためには国の支援が不可欠であり、本事業をナショナルプロジェクトとしてNEDOが実施することには意義がある。

なお、本事業は、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

### **2.2. 実施の効果**

本事業では、後天的ゲノム修飾の効率的な解析手法、高感度で検出するシステムを構築する。さらに、癌をはじめとする疾患の原因となる後天的ゲノム修飾を解明し、後天的ゲノム修飾による疾患制御のメカニズムを生かした医薬品開発の基盤技術を確立する。

この基盤技術をプロジェクト実施期間中に学から民へと移管することにより、企業における医薬品開発の効率化が期待できる。

さらに、個人の後天的ゲノム修飾情報に基づくオーダーメイド治療が実現されれば、国民の健康維持・増進、医療財政の負担軽減、医薬品産業の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。

## II. 研究開発マネジメントについて

### 1. 事業の目標

後天的ゲノム修飾を制御する薬剤開発を推進するための基盤を構築するとともに、本研究事業の成果として5つ以上の創薬・診断標的分子を同定し、構築した創薬基盤の妥当性を実証する。そのために、下記のマイルストーンを設定する。

中間目標（平成24年度）：

腫瘍細胞から取得したエピゲノム情報に基づいて選定するエピゲノム創薬・診断標的5候補分子に対してアッセイ法を構築し、うち2分子については創薬・診断の指標としての妥当性を実証することを目指す。網羅的エピゲノム解析技術の開発、改良を行い、現行の10倍以上の感度を達成する。

最終目標（平成26年度）：

選定するエピゲノム創薬・診断標的15候補分子に対してアッセイ法を構築し、5分子については創薬・診断の指標としての妥当性を実証することを目指す。臨床試料のエピゲノム解析技術の開発、改良により、現行の100倍以上の感度を目指す。

## 2. 事業の計画内容

### 2.1. 研究開発の内容

エピゲノム修飾を標的とした、癌の診断及び治療法開発のための基盤技術を開発するために、以下の4つの研究開発項目を実施する。

なお、本研究開発の実施機関は、平成22年度から平成26年度までの5年間とする。

研究開発項目①	「後天的ゲノム修飾解析技術開発」
研究開発項目②	「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」
研究開発項目③	「探索的実証研究」
研究開発項目④	「総合調査研究」

研究開発項目毎の実施項目を下表に示す。

表 研究開発項目毎の実施項目

研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」
(1) 後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発
① DNAメチル化の網羅的解析技術開発
② 高感度エピゲノム解析技術開発
③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発
④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発
(2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発
研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」
(1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発
① 臨床検体の収集と病理解析
② Xenograftパネルの研究開発
③ エピゲノム変異発癌モデルの研究開発
④ エピゲノム修飾の特異性を規定する非コードRNA機能の研究開発
⑤ 癌診断メチル化マーカーに関する研究開発
⑥ 癌細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発
研究開発項目③「探索的実証研究」
(1) 後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発
(2) 探索的実証研究
研究開発項目④「総合調査研究」

以下に、研究開発項目毎の研究概要を示す。

#### 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

ヒストン修飾解析等に必要となる多種類の解析用抗体からなる抗体パネルを作成し、複数種類の癌のヒト臨床サンプルおよび代表的なヒト正常細胞を対象として、多種類のヒストン修飾や修飾因子を系統的にマッピングする技術を開発する。

エピゲノム修飾解析技術の情報解析基盤技術の開発に加え、エピゲノム修飾を解析して得られる膨大な情報と既存の生命情報データを統合し、取得データから必要な情報を効率的に抽出し可視化するために、IT技術等を活用した新たな標準的情報処理技術を開発する。

(1) 後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

① DNAメチル化の網羅的解析技術開発

癌細胞における後天的ゲノム修飾異常の中核をなす、異常DNAメチル化の網羅的探索技術の開発を目標とする。生理的な発生分化の過程では、DNAメチル化は長期的に安定な遺伝子発現抑制に重要な役割を果たしているが、癌細胞には数多くのDNAメチル化異常が蓄積している。また、癌抑制遺伝子や細胞周期関連遺伝子などの癌関連遺伝子のプロモーター領域にみられるメチル化は、その遺伝子発現抑制を通じて、癌化に深く関連していることが知られている。こうした癌化に重要なDNAメチル化異常を網羅的に探索することで、癌化に関連するメカニズムの解明と創薬標的分子の同定につながる事が大いに期待される。さらに、化学的に安定なDNAメチル化修飾は、血清診断における分子マーカーとしても有用であると考えられる。

数年来、高密度マイクロアレイや高速シーケンサーの進歩により、数多くの網羅的メチル化解析手法が開発されてきたが、いずれの手法もそれぞれ短所長所をあわせもっており、癌細胞における転写制御異常の解明や臨床応用可能な分子マーカーの探索に応用していく上では、まだ十分とはいえない。例えば、近年の網羅的DNA解析研究においては、CpGアイランドのみならず、その周辺領域のDNAメチル化の挙動も注目されている。エピジェノタイピングアレイを使用した解析の場合には、プローブのメチル化情報は1 CpGごとの限局的な情報となるため、メチル化DNA免疫沈降法 (MeDIP-seq法) との比較は、プロモーター領域のメチル化状態を正確に評価する上で重要である。一方、MeDIP-seq法を多数の癌臨床検体へ応用するには、依然いくつかの問題点が存在する。コストパフォーマンスの面では、2008年当時と比較すると、2010年5月現在の次世代シーケンサーのパフォーマンスは百倍近い性能の向上がみられ、1サンプルの解析に必要な2,000~3,000万タグ程度のリードを、1レーンで読むことが可能となっており、癌臨床検体を複数症例で検討することが現実化したと言える。

そこで、現在利用可能なプラットフォームの利点を十分に生かした標的分子探索を進めると同時に、現状の解析技術の問題点を克服し得る、高感度かつ高精度な技術開発の向上に取り組む。

## ② 高感度エピゲノム解析技術開発 (組織検体の解析)

ChIP-seq 法の開発によって、タンパク質の遺伝子上での存在部位が同定可能となり、転写及びクロマチン修飾の研究が飛躍的に進展した。一方、クロマチン免疫沈降においてタンパク質と DNA をホルマリンで結合させる反応は、試薬の到達が均一である培養細胞において確立したものであった。しかしながら、核内に比較的少量しか存在しないタンパク質の場合には大量の細胞数が必要であること、培養細胞も協調的に培養しないと特徴的な変化が観察できないことから、特定遺伝子の発現抑制下にクロマチン免疫沈降を行うには、大量の実験試薬が必要である。また、人工的な実験環境ではなく生体内腫瘍組織においての生理的なクロマチン構造の観察には、組織検体の解析が必要である。さらに、特定遺伝子を改変した実験動物資源を活用できれば、より明確な変化の観察が可能となる。

従来法では、5 mm 立方程度に細切した組織内部へのホルマリン到達には、低温で一晩要していたが、これでは固定条件が不均一であり、免疫沈降には不適である。また、組織をガラス製ホモジナイザーや機械的破碎装置で調製する場合、タンパク質 DNA 複合体の温度上昇が避けられない点が課題となる。これまでに、比較的柔らかい実質臓器に加えて、筋肉、心臓など、従来のガラス製ホモジナイザーや機械式破碎装置 (ポリトロン) では破碎困難な組織、微量すぎてホモジナイザーでは扱うことができない組織において、迅速に RNA を抽出するために凍結粉碎法を開発してきたことから、ChIP 操作の際に、凍結粉碎装置による破碎及びホルマリンによる固定を試みる。

### (トランスクリプトーム解析)

転写産物の包括的解析（トランスクリプトーム解析）は、エピゲノム修飾が染色体機能に与える影響を評価する上で不可欠である。従来、主にマイクロアレイによって行われていた RNA の解析では、専ら発現量の量的変動のみを捉えていたが、高速シーケンサーを用いて個々に配列解読を行うことにより、飛躍的に精度を高めて行う。RNA の配列解読では、通常のゲノム DNA の配列解読では簡単に得ることのできない、トランスクリプトの発現量、腫瘍特異的スプライスバリエント、新規の non-coding（タンパクをコードしない）トランスクリプトの同定も、同時に可能となる。

癌細胞では、染色体転座によって形成されるキメラ遺伝子は、絶好の治療標的遺伝子であり、RNA の配列解読による標的探索が有効である。従来、血液系腫瘍を中心に、MLL、AF10 などのヒストン修飾因子の特徴的なキメラ遺伝子が報告されている。近年、上皮系腫瘍においてもキメラ遺伝子が存在することが複数報告され、体系的に RNA の配列解読（以下、RNA-seq）を行うことで、新規のエピゲノム修飾に関する治療標的の発見が期待されるため、RNA-seq によって、癌における様々な RNA レベルの異常を検出する技術の開発を行う。

#### （高感度ヒストン修飾解析）

エピゲノム創薬を実現化するためには、少量の臨床組織からでも、感度よくエピゲノム解析を行うことが可能なシステムの開発が必要である。つまり、現在、 $10^6$  個程度の細胞数が必要とされる ChIP-seq 法を、 $10^4 \sim 10^3$  規模の細胞数で実施することができれば、種々の疾病に伴うエピゲノム変化も捉えることが可能となり、創薬、治療の現場で実際に使用可能な技術となり得る。3年以内に、なるべく実験上のバックグラウンドを排除し、少なくとも  $10^4$  個の細胞数での ChIP-seq 解析の実現を目標とする。

#### ③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発

エピゲノム解析の微量化を進めるためには、高感度かつ高特異的にヒストン修飾を検出するシステムの構築が必要であり、その鍵となるのが特定部位の修飾を選択的に認識する抗体である。

市販されている修飾ヒストン抗体のほとんどはウサギポリクローナル抗体であり、その品質はロットによって異なるため、抗体の品質をその都度検証する必要がある。大阪大学の研究担当者は、クロマチン免疫沈降に使用できる特異性の高いマウスモノクローナル抗体を多くのヒストン修飾に対して作成し、ヒストン修飾抗体の評価と開発に実績がある。そこで、これまでに開発したヒストン修飾特異的抗体の供給を行うほか、その実績を生かして、エピゲノム解析の微量化に必要な、高特異性・高親和性抗体の評価と開発を行う。

#### ④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発

主要なエピゲノム修飾であるヒストン修飾の解析法を確立し、疾患特異的ヒストン修飾解析の基盤技術とする。ヒストン修飾の組み合わせコード（アセチル化、リン酸化、メチル化修飾の組み合わせを判定）を測定するため、質量分析法等を用いた解析基盤技術を構築するとともに、解析に必要な検体の微量化を実現する高感度解析技術を開発する。

中間目標は、H4 テールプロファイリング技術の確立である。さらに解析によって明らかになった主要な修飾に対する定量技術を確立する。

最終目標は、ヒストン H3、H2 を含めた主要ヒストン修飾プロファイリング解析手法を確立し、研究開発項目③の探索的実証研究に用いることである。

ヒストンは塩基性が高く、多価の複雑な MS/MS スペクトルになる。これまでに、高精度質量分析計 orbitrap を使い、修飾に適した MS/MS を単純化する解離方法 ETD (electron transfer dissociation) 法を使い、LC/MS の結果を二次元ペプチドマップに展開し比較する方法を確立している。この方法

で、ヒストン H4 テールの継時的修飾変動の解析を行う。

同様の手法を用いて、H3 及び H4 ヒストンテールコードのダイレクト質量分析解析法の開発を行い、後天的ゲノム修飾の中心であるヒストン修飾の解析法を確立し、疾患特異的ヒストン修飾解析の基盤技術とする。従来型の H3K9、H4K20 など、1 つの修飾特異的抗体を用いた ChIP-seq 等による間接的解析だけでなく、主要なヒストンコードの包括的プロファイリング解析の系を確立することは、後天的ゲノム修飾の解析の重要な技術となる。

## (2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発

後天的ゲノム修飾解析のためには、DNA メチル化情報、ヒストン修飾情報、RNA 発現情報の関連性の解明が必要である。これらの情報はいずれも全ゲノム規模の情報であるが、特定のエピジェネティックな制御因子を同定するためには、複数の組織・細胞を用いて、複数の条件（刺激/ストレスの有無等）による測定が必要である。さらに、関連情報（他のグループで測定されていて利用可能なもの）と独自の測定結果とを比較することも必要である。このように膨大な情報量を効率よく扱うため、測定情報をデータベース化してプロジェクトメンバー間で共有したり、エピゲノムに特化した情報ツールを提供する、エピゲノム情報解析基盤を構築する。

エピゲノム情報サーバ構築およびエピゲノム制御因子予測ツール開発については、大容量高速演算装置を有する産総研で開発を行い、集中研において使用する。

## 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

どのような後天的ゲノム修飾の変化によってどのような後天的疾患が発生するか、疾患と後天的ゲノム修飾の関連づけを行う。解析対象となる複数種類の癌のヒト臨床サンプルを効率的に収集し、研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術も活用して、後天的ゲノム修飾の組み合わせの解析等により得られる情報基盤を用いて疾患と正常の比較分析を行うことにより、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を探索するとともに、新たな創薬・診断の標的候補分子を同定する。

### (1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

#### ① 臨床検体の収集と病理解析

(再発、転移を含めた経時的組織バンキング体制の確立)

東京大学附属病院胃食道外科、肝胆膵移植外科、呼吸器外科と連携を取り、臨床情報、病理報告書とも連結可能な状態でバンキングを行っている。いずれも、新鮮凍結検体の収集を基本として、長鎖 RNA を含めた解析に耐える品質管理の下に、すでに胃癌、肺癌、肝臓癌について 100 例程度の症例の蓄積を行っている。

新たな癌治療薬が続々と開発されており、新規症例を継続的にバンキングすることも重要である。東京大学病院、及び共同実施先である癌研究所病院も合わせることで、十分な症例数を確保できると考えられるが、さらに解析症例を増やす必要がある場合には、関連施設に検体収集を依頼する。

(組織アレイを用いたタンパク、核酸の評価系の構築)

組織アレイは、病理組織標本から 2 mm 以下の細い円筒状組織を打ち抜いて、多数の組織を整列させ、一つのブロックに包埋するもので、ハイスループットなタンパク発現局在の分析を行うことができる。

現在すでに、多数の癌組織（胃癌、肝癌、肺癌、膀胱癌、膵臓癌、腎癌、脳腫瘍、大腸癌）、及び

対応する正常組織について、それぞれ 200 症例程度の組織アレイを作成している。

## ② Xenograft パネルの研究開発

癌研究会有明病院は国内最大級の癌専門病院であり、豊富な症例数は勿論のこと、臨床学的、病理学的情報を基にした患者のゲノム解析についても、倫理的な取り扱いも含め、豊富な経験を有している。

本プロジェクトで開発されるエピゲノム修飾解析基盤技術を活用して、疾患発症に関わるエピゲノム修飾異常を引き起こす原因分子の探索と検証を行うため、複数種類の癌について、臨床検体（腫瘍組織）と詳細な臨床情報を効率的に収集する。

一方、臨床検体のみでは採取量に限界があるため、同一症例から配列解析、エピゲノム解析を行い、エピゲノム修飾異常と疾患とを関連づけ、新たな創薬・診断の標的候補分子の同定を行うことは極めて困難であり、手術材料から得られた腫瘍組織を用いて、培養細胞株や xenograft を樹立し利用することが、本プロジェクトで開発される基盤技術を用いた標的分子の探索に有用と思われる。

とりわけ、膵癌やスキルス胃癌のように間質成分が豊富な腫瘍では、切除組織を直接解析することが極めて困難であるため、xenograft 化することにより解析精度を向上できるほか、由来する細胞株を用いて、薬剤感受性テストを行うことができる。

## ③ エピゲノム変異発癌モデルの研究開発

肝癌や膵癌を自然発生する遺伝子改変マウスを用いて、ヒストンメチル化及び脱メチル化が、癌発生にどのような役割を持つのかを検討する。東京大学先端科学技術研究センターにはマウス遺伝子操作を行う施設がないため、マウスの作成及び維持は京都大学で実施し、機能解析を東京大学にて実施する。とりわけ、発癌モデル実験を行うためには大規模なマウス飼育施設が必要となるため、本郷キャンパスにて実施する。

（既存癌モデルの解析）

肝癌や膵癌を自然発生する遺伝子改変マウスを用いて、ヒストンメチル化及び脱メチル化が、癌発生にどのような役割を持つのかを検討する。

（新たな癌モデルの開発とその表現型のエピゲノム解析）

PR (PRDI-BF1 及び RIZ) ドメインタンパク質 (PRDM) は、PR ドメインと zinc-finger ドメインを持つ分子ファミリーで、PR ドメインはヒストンリジンメチル化活性を持つ SET ドメインとも相同性を有することから、SET ドメインサブファミリーと分類されることもある。実際、PRDM のいくつかはヒストンリジンメチル化活性を示す。

近年の解析から、PRDM はさまざまな細胞の運命の決定に重要な役割を果たすこと、さらに癌細胞において、その発現が消失することが報告されている。PRDM5 は、さまざまな種類のヒト癌細胞において、その発現が抑制されていることが知られている分子で、PRDM5 を PRDM5 陰性の癌細胞に強制発現させると、細胞増殖を阻害することも報告されている。

## ④ エピゲノム修飾の特異性を規定する非コード RNA 機能の研究開発

近年、クロマチンを構成するヒストンの修飾パターンと修飾酵素が次々と同定され、遺伝子発現との対応関係が解明されつつあるが、その一方、ヒストン修飾酵素が特定の染色体領域を認識して修飾反応を行うメカニズムについては、未だに明らかになっていない。

ヒストン修飾酵素の作用部位決定及び活性制御に、非コード RNA (non-coding RNA : ncRNA) が関わっている可能性がある。非コード RNA については、哺乳類ゲノムから多数産生されていることが明らかになり、その機能に注目が集まっている。酵母やショウジョウバエの先駆的研究によっ

て、遺伝子プロモーター領域から転写される ncRNA が、近傍遺伝子の転写を正または負に制御している例が見出されている。

哺乳類でも、XIST や Air などのゲノムインプリンティングに関わる ncRNA が古くから知られており、最近の知見では、多数の ncRNA が共通してヒストンメチル化酵素複合体 PRC2 と複合体を形成し、クロマチン領域の不活性化 (H3K27 トリメチル化) に関わることが報告されている。さらに、Hox 遺伝子クラスターから転写される Hotair ncRNA が特定の Hox 遺伝子領域のヒストン修飾に関わっており、ゲノム修飾のリプログラミングを通して、癌悪性化 (転移能獲得) に重要な機能を果たすことが明らかにされている。

そこで、エピゲノム制御と疾患を結びつける ncRNA に注目し、疾患遺伝子の発現制御に関する ncRNA 取得と、それらの作用機構の解明を目指す。さらに、RNA 機能を人為的に操作することによって、ゲノム領域上の特異的な修飾をコントロールする可能性を検討する。本研究開発は、ncRNA の核内ノックダウン法を樹立した産総研グループとの共同で実施する。

具体的には、

- RNA-seq による癌関連 ncRNA の取得
- ncRNA の作用機構の解明
- ncRNA に着目した新規後天的ゲノム制御技術の開発を実施する。

#### ⑤ 癌診断メチル化マーカーに関する研究開発

近年、癌に関連し、メチル化修飾される遺伝子 (メチル化遺伝子マーカー) を血液検体から検出する技術が報告されている。血液を対象にした検査は、簡便性、生理的受容度が高く、検査法として有力な候補と考えられているが、実際に臨床応用されているマーカーはまだない。そこで、研究開発項目①において開発された DNA メチル化解析技術を用いて、臨床有用性の高い新規のメチル化遺伝子マーカーを探索し、スクリーニングへの応用可能性を検討する。

#### ⑥ 癌細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発

腫瘍細胞のゲノムにおいて、MLL、Dot1L、UTX、Tet1、NSD1 などのヒストン修飾酵素や DNA 脱メチル化酵素の遺伝子変異が報告されている。それら変異した修飾酵素は薬剤開発の絶好の標的分子であり、ゲノム配列解析による変異同定が有効である。制御機構の異常のため癌細胞特異的に高発現する症例もあり、発現プロファイリングまたは RNA-seq による探索が有効である。

一方、エピゲノム修飾剤の作用機序を考えた場合に、細胞増殖に顕著なダメージを与えるよりは、むしろ癌細胞のロバストネスを標的として、癌細胞の生き残り戦略に対するダメージを検討する手段もある。

癌細胞の重要な特徴として、低酸素耐性が挙げられる。多くの正常細胞が低酸素下では分裂を速やかに停止し、アポトーシスやネクローシスを介して細胞死に至るのに対して、癌細胞は腫瘍血管がまだ誘導されない発癌の初期段階においても、生存・分裂することができる。

さらに癌細胞は、血管新生因子 (VEGF) の誘導を介して血管を誘導することで低酸素環境の改善を行い、上皮間葉転換を引き起こすことで、低酸素環境下からの離脱を行う。周辺の組織への浸潤や遠隔転移は癌の悪性化と密接に関係していることから、これらのプロセスを制御するための標的分子を探索する必要がある。

そこで、癌細胞株と初代培養細胞の間で、低酸素あるいは低栄養といったストレスを与えた際のエピゲノムの変化を比較する。

これらの新たな創薬標的候補分子は、次世代の抗癌剤開発の標的としての潜在的価値を持つが、

より特異性が高く選択的な標的を絞り込むため、多くの DNA/ヒストン修飾酵素遺伝子に対して検証済である shRNA パネルを作成する。

細胞の表現型の解析基盤として、ヒストン修飾酵素遺伝子群に対する shRNA パネルを活用し、ヒストン修飾因子の発現抑制が表現型にどのように影響するか、*in vitro* の癌細胞株から *in vivo* への段階的な解析系を用いて検討する。

これらの発現・配列変異解析、およびエピゲノム解析の統合データをふまえて、選定された標的分子の細胞表現型の解析を通じて、癌とエピゲノム修飾異常との関連を検討する。

### 研究開発項目③「探索的実証研究」

研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術をベースとして、標的分子に対する後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析する手法を開発するとともに、多数の試験サンプルに対して適応可能な、高感度かつ高精度なハイスループットアッセイ法を構築する。

また、*in silico* 化合物スクリーニング等の IT 技術とともに天然化合物ライブラリ等も活用して、後天的ゲノム修飾と複数種類の癌とを関連づける複数の創薬・診断の標的候補分子に対し、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を高感度かつ高精度な定量的アッセイ法を用いて複数個程度同定し、モデル生物等による検証も通じて標的としての妥当性を検証することによって、本事業で開発した後天的ゲノム修飾に着目した創薬基盤技術の有用性を実証する。

#### (1) 後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発

研究開発項目①で開発した質量分析計によるヒストン修飾の組み合わせコード解析技術を基に、複数の標的分子に対して選択した複数の修飾組み合わせパターンを、三連四重極質量分析計を用いて一度に定量するハイスループット修飾組み合わせ定量系の開発を行う。

ヒストン修飾の組み合わせは、ヒストン H4 だけでも 100 種以上、H3 では理論的な組み合わせは 1 万を超える。これらの膨大な組み合わせを網羅的に解析することは極めて困難である。そこで、研究開発項目①で開発した技術を用い、研究開発項目②で選択された創薬・診断標的候補分子の妥当性評価のため、標的分子におけるヒストン修飾組み合わせの変化を、Orbitrap 質量分析計を用いて解析する。

この解析により、多数の修飾組み合わせの中から実際に変化する組み合わせを選択し、定量系を構築する。定量は、100 種以上のタンパク質の一斉定量が可能な技術である、三連四重極質量分析計を用いた選択的反応モニタリング (SRM) で行う。

MALDI-TOF/MS を用いたスクリーニング系では、ペプチドの質量情報が得られるため、放射性同位元素を用いた実験と比べ、メチル化の量や 1 ペプチドへのメチル基導入数が正確に分かる。また同時に、MS/MS 解析によりメチル化されたアミノ酸部位の解析も行える。

この修飾組み合わせ定量技術を次項目 (2) 探索的実証研究の化合物評価に使用することで、構築した定量系の妥当性を検討する。

#### (2) 探索的実証研究

本プロジェクトで開発された基盤技術、および新規の創薬診断標的分子の有用性を実証することを目的に、研究開発項目②で実施する研究開発、及び予備的検討から選定された 15 以上の創薬標的分子に対して、活性ドメインの構造決定と *in silico* スクリーニングを行い、研究開発項目③の (1) で新たに開発したアッセイ系も活用して、活性を阻害する化合物を探索する。得られた化合物について、腫瘍細胞及び xenograft を用いて、機能評価、エピゲノム修飾に与える影響について検討し、

標的分子としての妥当性を評価し、構築した基盤技術の有用性を検証する。

先行研究に基づく標的候補分子としては、以下の4分子を実証研究の対象とする。

- PR-SET7 :** ヒストン H4K20 メチル化酵素として知られるが、白血病細胞株 K562 で siRNA により PR-SET7 の発現抑制を行うと、巨核球への分化促進されることが報告されている (Sims J, et al., Mol. Cell. Biol., 2008)。後天的ゲノム修飾をターゲットとする新しい作用機序をもつ分子標的薬は、白血病治療薬となる可能性がある。
- G9a :** ヒストン H3K9 メチル化酵素として知られる。癌の治療、iPS 細胞の誘導促進の可能性を持つ分子であり、既に構造解析も行われている。PR-SET7 と共に、先行研究を行うのに適している。
- EZH2 :** EED、SUZ12、AEBP2、RbAp48 と PRC2 複合体を構成する SET ドメインを持つタンパク質であり、H3K27 メチル化活性、及び染色体のヘテロクロマチン化による遺伝子発現抑制作用を持つと考えられている。このような複合体を解析する系を立ち上げることは、他の複合体タンパク質にも応用可能である。  
EZH2 は前立腺癌や乳癌、肺癌など様々な癌で発現が亢進し、またその発現量は、癌転移などの悪性度や患者の予後とよく相関することが報告されている。In vitro での EZH2 発現抑制により前立腺癌の増殖抑制や転移抑制効果が認められることから、EZH2 阻害剤は、これらの癌の有効な治療薬となり得る。
- JMJD1A :** JmjC ドメインを有するヒストン脱メチル化酵素の一種である。JmjC ドメインは、Fe(II) イオン及び 2-オキソグルタル酸をコファクターとして、H3K9me2 及び H3K9me 特異的に脱メチル化反応を触媒する。  
血管内皮細胞において、JMJD1A が低酸素下で HIF1A によって誘導され、固形腫瘍は増殖に伴って中心部が低酸素環境となることから、腫瘍栄養血管新生への JMJD1A の関与が推測される。そこで、H3K9 の脱メチル化介入により、病的条件下での遺伝子発現を網羅的に抑制する新規治療法となる可能性がある。

#### 研究開発項目④「総合調査研究」

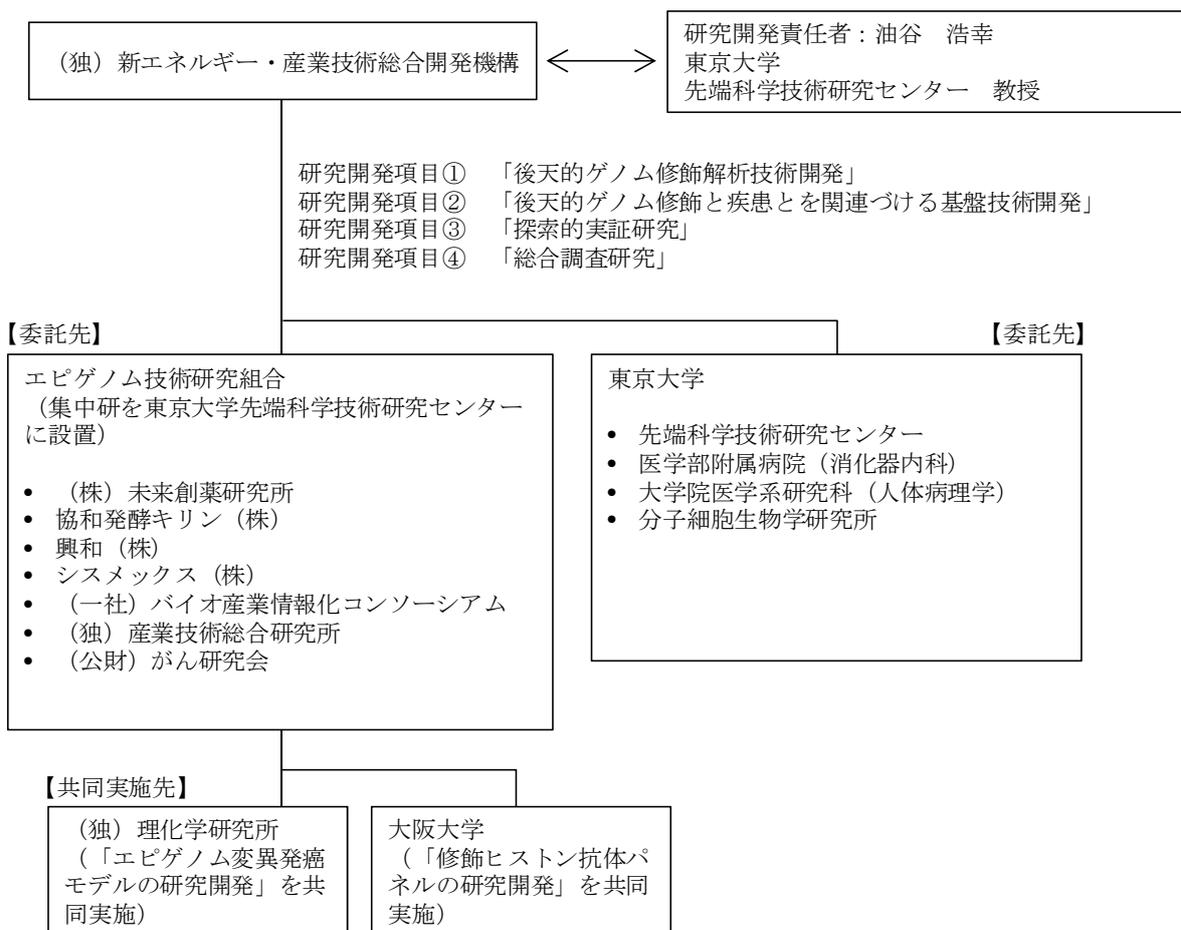
エピゲノム技術開発研究に関わる研究促進のための活動を中心とし、国内外の技術動向調査及び情報収集を行う。特に、進歩が目覚ましい次世代シーケンサーや質量分析技術の進展は、研究開発項目①及び②と密接に関係しており、この技術動向は今後のプロジェクト戦略を考える上で必要であるので、主たる調査研究として実施する。また、本プロジェクト実施内容に関連する外部動向調査（エピゲノム解析やメチル化酵素阻害などの阻害剤開発動向）を継続的に行うことも必要となる。

## 2.2. 研究開発の実施体制

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の公募により、国立大学法人東京大学及びエピゲノム技術研究組合（集中研を東京大学先端科学技術研究センターに設置）を研究開発実施者として選定した。

本研究開発の研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を東京大学先端科学技術研究センターの油谷浩幸教授とし、研究開発項目毎にサブリーダーを置いた。さらに、集中研を東京大学先端科学技術研究センターに設置する集中研究方式により、効率的な研究開発を実施するものとした。

<実施体制図>



## 2.3. 研究開発の運営管理

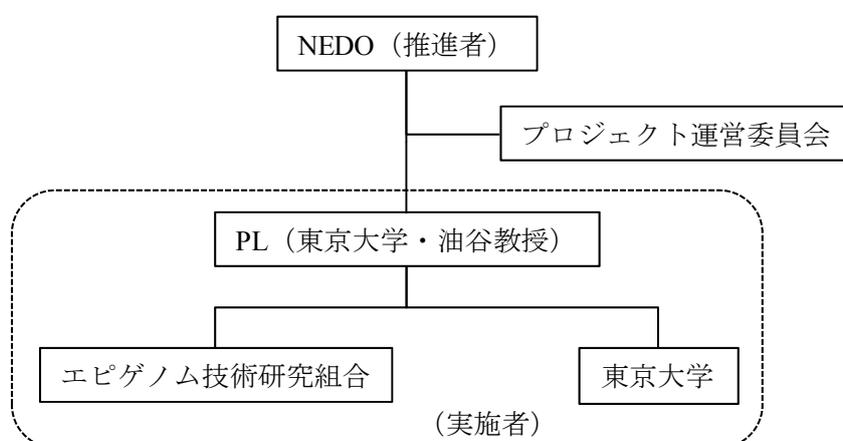
プロジェクトを効率的かつ効果的に遂行するために、下図の通り、NEDO 主催のプロジェクト運営委員会を設置している。

プロジェクト運営委員会は、プロジェクト全体の運営に対する提言を行うものであり、中立性を保つために、プロジェクトに直接携わらない外部有識者で運営委員を構成した。なお、採択時の審査結果との連続性を担保するために、複数名の採択審査委員を運営委員に加えている（下表）。

第1回プロジェクト運営委員会を、平成24年3月1日に開催した。

第2回プロジェクト運営委員会は中間評価後に開催予定であり、中間評価結果を受け、必要に応じてプロジェクト推進方針の見直しを行う。

その後も最終年度に向けてプロジェクト運営委員会を適宜開催し、最終研究開発成果のとりまとめ、及びその実用化に向けた具体的な提言を行うものとしている。



プロジェクト運営委員会運営委員リスト

区分	氏名	所属役職
委員長	西村 善文	横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科 生体超分子システム科学専攻 教授
委員長代理	吉田 稔	理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室 主任研究員
委員	伊藤 隆司*	東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 教授
	伊藤 武彦*	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授
	久保田 健夫	山梨大学 大学院医学工学総合研究部 環境遺伝医学講座 教授

\* 採択審査委員

## 2.4. 研究開発成果に係る知財マネジメント

研究開発成果に係わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て受託先に帰属させるものとする。

エピゲノム技術研究組合においては、知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則としている。

## 3. 情勢変化への対応

平成23年8月に加速資金180百万円を投入した。

平成22年10月に開始した本プロジェクトにおいては、半年間で膀胱癌、肝癌、肺癌、大腸癌、胃癌をはじめとする9種類の癌種を対象に400を超えるヒト臨床検体のDNAメチル化解析・ヒストン修飾解析を実施し、新たな創薬標的分子4個を見出すとともに、一度に50以上のヒストンH4テールの修飾組合せの分離が可能になるなど、目覚ましい成果を上げているが、解析に使用するシーケンサーや質量分析計はいずれも数年以上前に購入したものであり、機器の老朽化とともに、最新機器と比較してサンプル処理速度や感度の低さが課題となっていた。

一方で国外の動向を見ると、米国の国立衛生研究所(NIH)、欧州の第7次研究枠組み計画(FP7)では、後天的ゲノム修飾研究のために次世代シーケンサーや最新式の質量分析装置などを数十～数百台規模で導入しており、国外の研究成果創出スピードに大きく遅れをとりつつあるのが現状である。

本加速資金投入により、最新式の次世代シーケンサー及びサンプル前処理装置を導入して後天的ゲノム修飾解析の大幅な効率化を図るとともに、膨大な後天的ゲノム修飾解析データの保存・処理に不可欠なデータサーバを導入した。さらに最新式の質量分析計と電子移動解離用オプション装置を導入して、頭打ちとなっていた後天的ゲノム修飾(ヒストン修飾)組合せ解析感度が飛躍的に向上した。この結果、新規創薬・診断標的の探索と同定が加速された。

具体的には、Illumina社のMiSeqシステムを導入することにより、後天的ゲノム修飾解析の最適化に要する時間が、従来の3日間から数時間程度に大幅に向上した。

さらに、Thermo Scientific社のLTQ Orbitrap ELITE及び電子移動解離用オプション装置ETDを導入することにより、当時使用していた質量分析装置では検出不可能だった100以上に及ぶヒストン修飾組合せパターンを検出することが可能になった。

## 4. 評価に関する事項

平成24年7月に中間評価を実施したのち、平成27年度に事後評価を実施する予定である。

### III. 研究開発成果について

#### 1. 事業全体の成果

エピゲノムという「ゲノムに加えられた後天的な化学修飾」の制御を通して新たな創薬分野を開拓することを目指すプロジェクトである。

既に DNA メチル化、ヒストンアセチル化については DNA メチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤が抗腫瘍薬として開発されてきた。一方、近年のエピゲノム解析技術の進歩により多彩なエピゲノム修飾が存在することが解明されつつある。例えば、DNA 脱メチル化におけるヒドロキシメチルシトシンの役割の解明をはじめとして、ヒストンや DNA の脱メチル化機構について明らかにされたのはまさにこの数年間のことである。そこで疾患を特徴付けるような「後天的」修飾を同定し、制御する治療法は新たな創薬分野となり、中間評価を迎える現在、エピジェネティクス研究はまさに疾患研究の中核になりつつある。

一方、ゲノム、プロテオーム解析において次世代シーケンサーや高感度質量分析装置などの技術革新の速度はますます加速化しつつあり、一企業がキャッチアップすることは困難であり、先進的解析技術および成果をイノベーションに生かしていくためにはアカデミアが果たすべき役割が大きい。また、ペタコン開発をはじめとする計算科学の進歩に伴い、分子動力学による立体構造予測が実用的レベルにまで達しつつある。これら産官学のリソースを集中研に結集したオープンイノベーション体制から *first in class* の医薬品開発を目指すプロジェクトである。現在、参画企業 4 社から合計 9 名の研究者が常時集中研において研究を実施している。

計画立案当初はエピゲノム研究自体がまだ基礎的であるというようなコメント（意見）もあり、技術開発と並行しながら、疾患としてまずは「がん」に注力して開始することとなった。良質なヒト腫瘍検体の確保および解析が必須であり、病理学教室に長年保存されたアーカイブである組織標本の利用に加え、創薬研究に繰り返し利用するにあたり、よりヒトの腫瘍検体に近い材料としてゼノグラフトの系統的樹立を行った。

創薬プロセスにおけるバイオマーカーの重要性が最近注目されている。エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンは前癌病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を様々な癌種において進めている。また、数十に及ぶヒストン修飾を個別に測定する技術は次世代シーケンサーを用いて確立されてきた一方で、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについては適切な解析技術がなかった。高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見いだしている。

当初、実証的探索研究としてかかげた 4 標的分子を含めて合計 11 分子の機能解析が現時点で進行中である。とりわけ、標的分子の妥当性の検証には標的分子の活性阻害活性を有する分子が腫瘍に与える影響を知ることが重要である。3 分子については *in silico* 創薬手法を用いてシード化合物が得られているほか、1 分子で従来型の HTS、4 分子で結合ペプチドスクリーニングを実施中である。

平成 23 年度より開始された文部科学省次世代がんプロジェクトにおいても、がんエピジェネティクスは基礎シーズの一つに取り上げられているほか、提供される化合物ライブラリースクリーニングを本 NEDO プロジェクトでも利用開始し、省間連携を積極的に実践している。

本プロジェクトは内閣府のアクションプランの「ライフィノベーション」施策としても取り上げられており、平成 23 年度は「優先」評価を受けている。国際競争の激化するなかで創薬基盤のみならず、その先の創薬シーズを参画企業に提供することを目指している。

事業全体の成果のまとめ

目 標	研究開発成果	達成度
事業全体	<p>エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンが前癌病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。また、数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて、高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見いだした。さらに、標的タンパク質 5 分子についてアッセイ系を確立した。</p>	達成
研究開発項目① 「後天的ゲノム修飾解析技術開発」	<p>数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援した。クロマチン解析の感度を 10 倍以上向上させ、特異性の高い抗体開発も推進した。</p> <p>全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを実施すると共に、DNA 脱メチル化に関わるヒドロキシメチルトシンの局在解析系を確立した。</p> <p>高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類のヒストン修飾組み合わせパターン検出を可能とした。</p>	達成
研究開発項目② 「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」	<p>アーカイブを用いた組織アレイによる迅速解析手法を構築した。</p> <p>創薬研究に繰り返し利用可能な腫瘍組織試料として xenograft の系統的樹立を行った。</p> <p>スクリーニングマーカーとして DNA メチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。</p> <p>数千に及ぶ ncRNA を RNA-seq およびエクソンアレイによって検討し、腫瘍組織で発現増加し、細胞増殖を亢進させる ncRNA を同定した。</p> <p>新たに創薬標的候補として 7 分子を同定した。</p>	達成
研究開発項目③ 「探索的実証研究」	<p>当初、実証的探索研究としてかかげた 4 標的分子を含めて合計 11 分子の機能解析が現時点で進行中である。そのうち 5 分子の標的分子としての妥当性を検証するために、3 分子については <i>in silico</i> 手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、1 分子については従来型のハイスループットスクリーニング、3 分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索している。</p>	達成
研究開発項目④ 「総合調査研究」	<p>次世代シーケンサー、質量分析装置の開発動向とエピゲノム研究における活用に関して調査を行った。</p>	達成

年度毎の特許、論文、学会発表の件数

区分 年度	特許出願			論文 (査読付き)	学会発表
	国内	外国	PCT※出願		
H22FY	0 件	0 件	0 件	20 件	18 件
H23FY	1 件	0 件	0 件	33 件	53 件

※Patent Cooperation Treaty：特許協力条約

## 2. 研究開発項目毎の成果

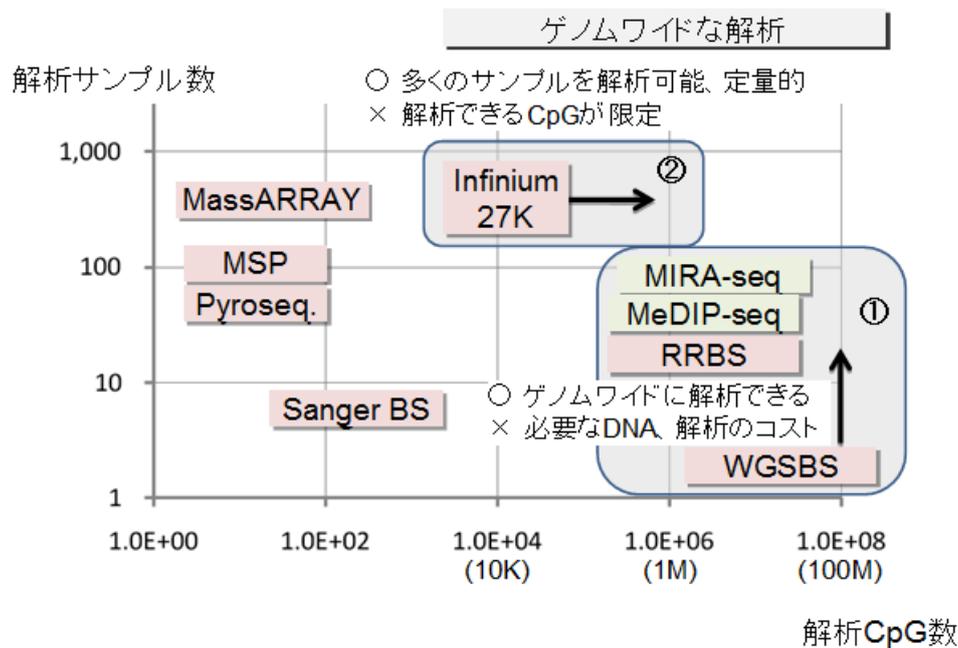
### 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

(1) 後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

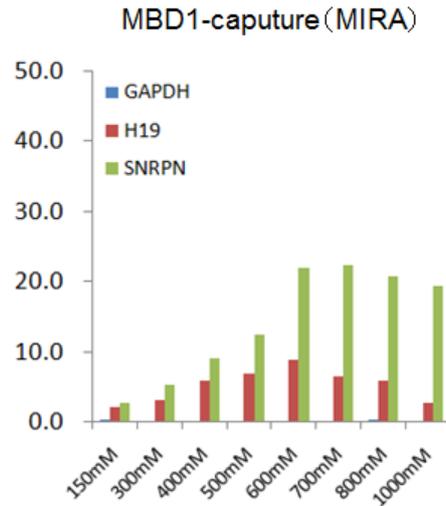
#### ① DNA メチル化の網羅的解析技術開発

エピジェノタイピングアレイは、バイサルファイト処理した DNA のジェノタイピングを行うことで DNA メチル化解析を行う。多数検体のハイスループットな異常メチル化部位のスクリーニングにはきわめて強力である反面、従来の 27K アレイは 1 遺伝子あたり平均 2 プローブが設計されているのみであり、プロモーター全体のメチル化情報を得るには不十分である。イルミナ社に協力して高密度化した 48 万箇所 CpG サイトを測定可能な 450K の次世代エピジェノタイピングアレイのデザインを行い、同様の性能を示すことを確認した。

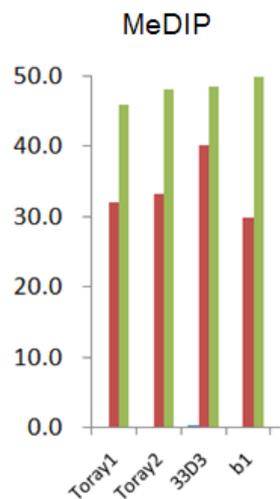
450K アレイでも 1 遺伝子あたり平均 7 プローブ程度であり、プロモーター領域の十分な情報は得られない。この欠点を補完する目的で、同一検体から、MeDIP あるいは MBD カラム法で捕捉・濃縮したメチル化 DNA の配列解析を実施した。本手法は、CpG 密度の高い CpG アイランド領域の解析に特に有効であり、ゲノム全域をカバーしうることから、プロモーター以外の CpG アイランドについても、新規異常メチル化部位の探索が可能となる。



MBD カラムあるいは MeDIP 法により網羅的メチル化解析に必要なゲノム DNA の最少使用量を臨床組織でも広く応用可能な 1  $\mu$ g に設定し、プロトコル条件の最適化や改良を行った。MBD カラム法では、500 nM を越える高い塩濃度のバッファーで洗浄した際に、メチル化の陽性領域である H19 と SNRPN の 2 カ所のコントロール領域で、高い濃縮率を得ることができたが、後述する抗体を用いた MeDIP 法の方が、より高い濃縮率を示した。

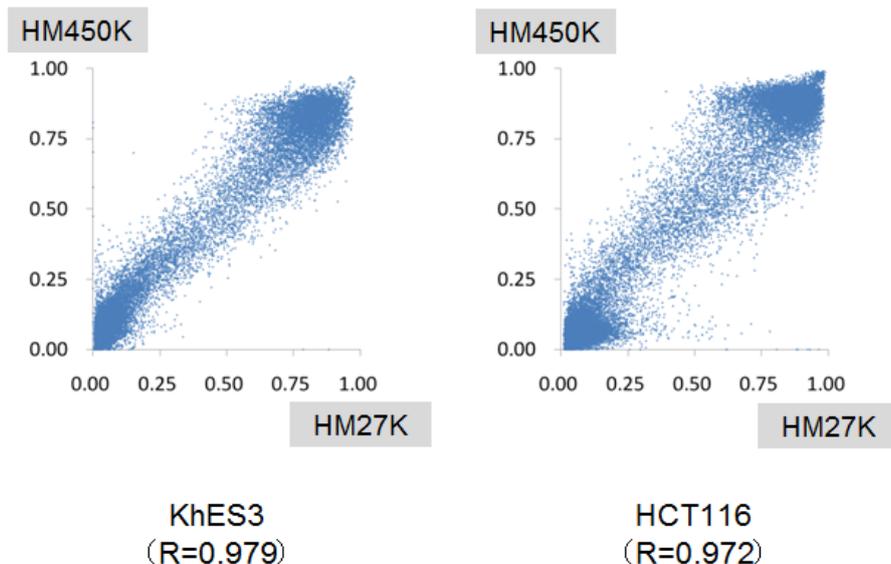


MeDIP 法に関しては、1  $\mu\text{g}$  の開始量で 10 ng の免疫沈降産物を安定的に得られるようプロトコルの最適化を行い、複数の抗メチルシトシン抗体でいずれも再現よく、20 倍を越える高い濃縮率を確認することができた。

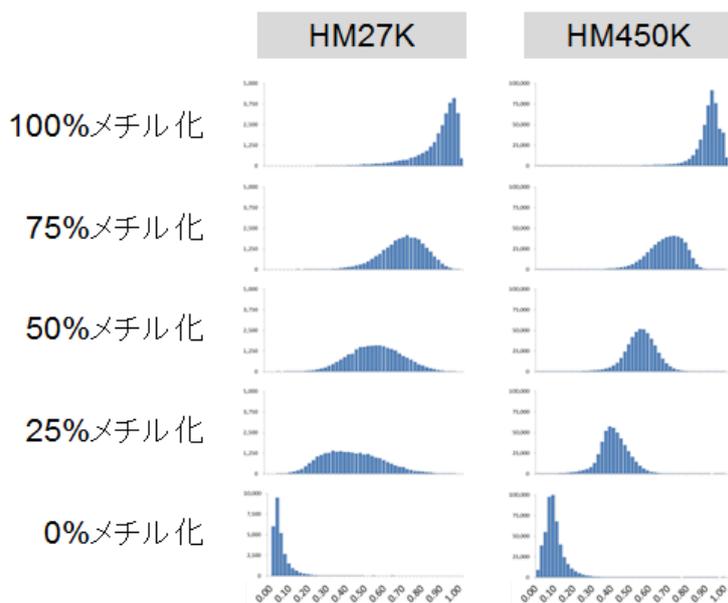


多数検体のハイスループットな異常メチル化部位のスクリーニングには、エピジェノタイピングアレイの定量性を確認する必要がある。従来使用されてきた 2 万 7 千カ所を解析できる HM27K と同等のパフォーマンスがあるかどうか、新しく 45 万カ所を解析できるようにデザインした HM450K の評価を行った。

下図に示すように、ヒト ES 細胞 (KhES3)、癌細胞株 (HCT116) のいずれにおいても、HM27K と HM450K の間で高い相関を確認することができた。

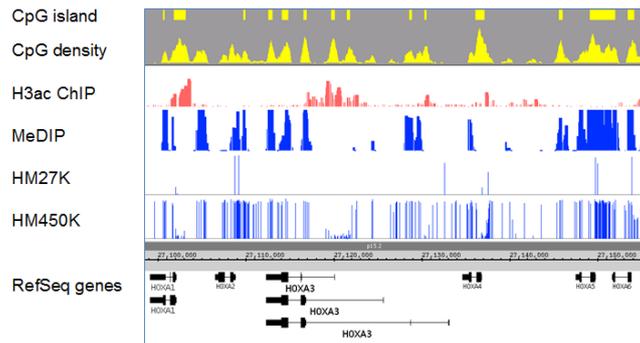


また、人工的に合成したメチル化コントロールゲノム (100%、75%、50%、25%、0%) を用いて、比較検討を行った結果、HM450K は 25%の違いを検出することができた。

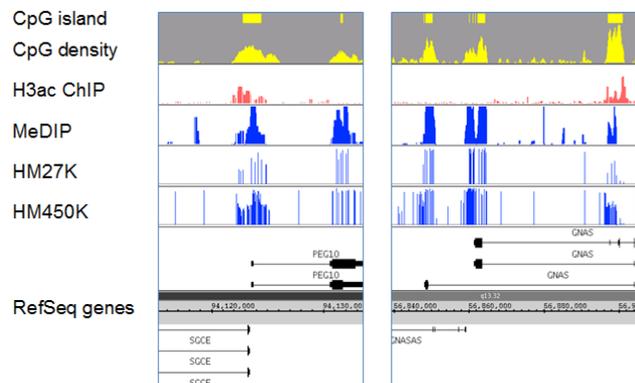


抗メチルシトシン抗体を用いた MeDIP シーケンス法と、エピジェノタイピングアレイ (HM27K、HM450K) による癌細胞株の解析例を下に示す。MeDIP 法で多くの CpG アイランドで高メチル化を示すピークを検出した。また、ピークを認めない領域には、活性型クロマチン標識である H3 のアセチル化のピークを示しており、両者の排他的な関係が良好に検出された。

MeDIP 法で検出したメチル化領域は、HM27K ではプローブ密度が低いために一部しか情報が得られないが、HM450K ではほとんどが一致しており、CpG アイランド以外の領域もカバーされている。



インプリンティング領域とよばれる部位は、父方と母方に由来するアリルでメチル化状態が異なる状態にある。以下に示すように、活性化型と非活性化型のアリルが 1 本ずつ存在するため、H3 アセチル化と MeDIP によるメチル化のピークが重なる領域となる。HM27K および HM450K では、これらの領域ではちょうど 50%前後の値を示しており、定量性よく検出できていることがわかった。



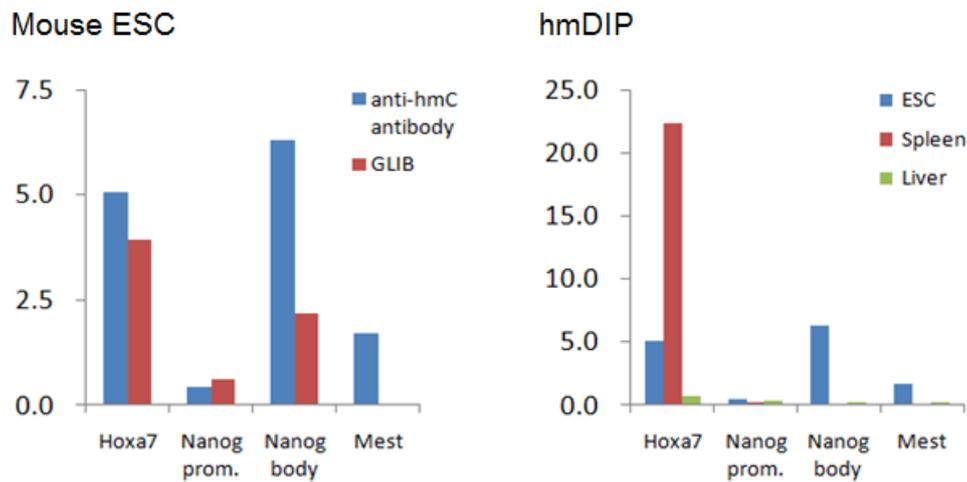
細胞分化の過程では、メチル化状態がダイナミックに変化するが、こうした解析でもメチル化の定量性が求められる。ヒト ES 細胞を肝細胞へと誘導した際に、肝臓特異的に発現する *APOA1* はプロモーター領域のメチル化が減少している。逆に、幹細胞で発現する *POU5F1* (*OCT4*) は徐々にメチル化が増加していることを確認することができた。



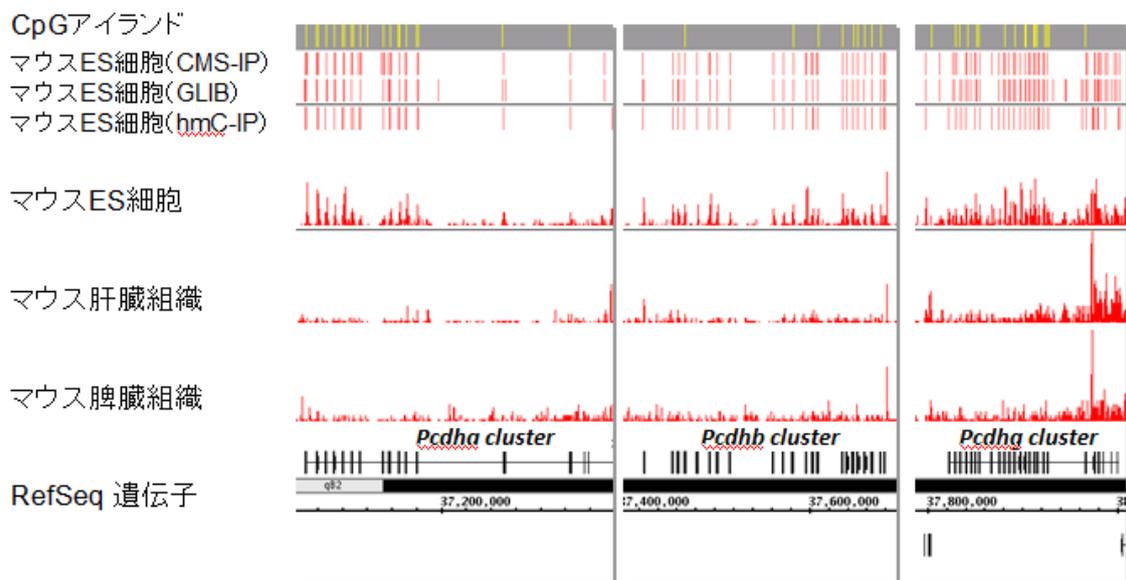
近年、発見された新規 DNA 修飾であるヒドロキシメチルシトシン (hmC) は、バイサルファ

イト変換による方法のみではメチルシトシン (mC) との判別が不可能であるため、抗ヒドロキシンメチルシトシン抗体を用いた免疫沈降法 (hmDIP 法) のゲノムワイドな検出系の確立をした。

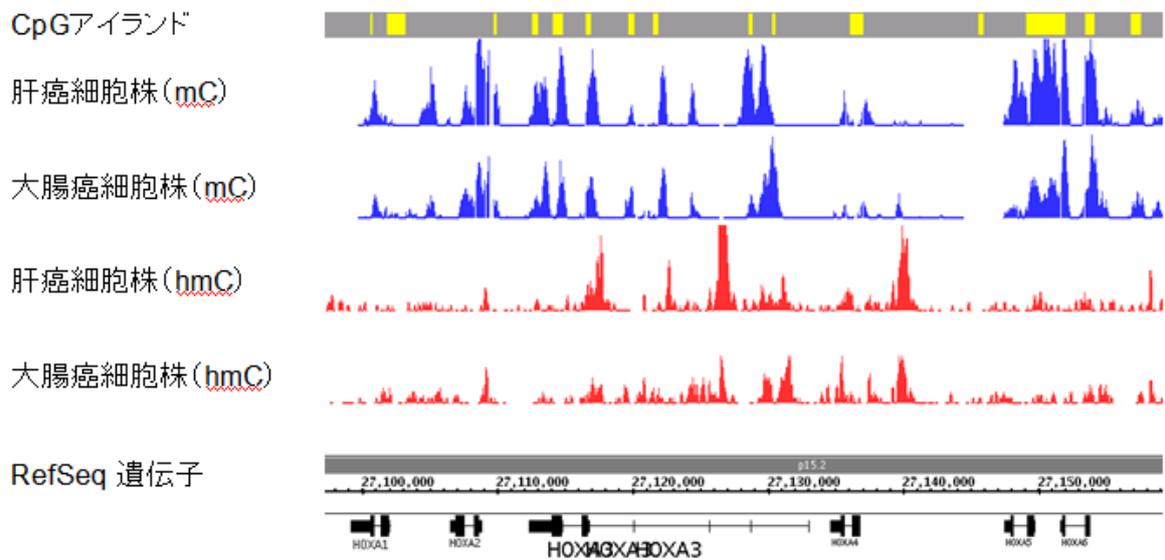
以下に示すように、hmDIP 法により、マウス ES 細胞の hmC 修飾領域を濃縮することに成功した。ビオチンを付加したグルコースを反応させて回収する GLIB 法と比較しても、遜色ない濃縮効率であり、ES 細胞以外にもマウスの正常臓器のゲノム DNA でも検出することができた。



マウス ES 細胞で、高度に hmC を認めるプロトカドヘリンクラスター領域を以下に示す。既報での陽性領域に一致して、hmDIP 法で良好に検出できることを確認した。



2 種類の癌細胞株で、メチルシトシンとヒドロキシメチルシトシンのマッピングを行ったところ、それぞれの修飾が別々の領域に分布していることを確認した。



同方法を、癌臨床組織にも応用し、癌特異的なヒドロキシメチルシトシンおよびメチルシトシンの修飾領域をそれぞれプロファイルできる系を確立することができた。

## ② 高感度エピゲノム解析技術開発

### (組織検体の解析)

凍結組織において破碎しながらクロマチン固定を行う条件の最適化を進めた。ヒストン H3K4me3 抗体による ChIP-Seq データを取得し、非凍結組織との比較を行った。

非凍結組織については、酵素を用いた細胞分画によって出来る限り均一な細胞集団を得ることも重要であるが、分離操作中にエピゲノム修飾が変化する可能性も否定できない。半自動組織粉碎機を用いることによりほぼ単一細胞にまで組織粉碎をし、エピゲノム修飾解析用の検体前処理の条件検討を行った。取得データの再現性などについて RNA-seq などの網羅的データによる検証を進めた。

### (高感度ヒストン修飾解析)

従来の ChIP-seq 技術においては  $10^7$  乗を超える細胞を対象としたタンパク結合プロファイル解析が常であり、 $10^6$  乗程度の細胞では不可能である。しかしながら、創薬、診断等への応用を考えた場合に、微量組織、微量細胞での解析は不可欠であり、技術開発が待たれている段階にある。そこで、小スケール ( $10^4$  乗) の細胞による感度の高い ChIP-seq 代替技術の開発に取り組んだ。力価の高い抗体は、少数細胞での ChIP 解析に非常に有効であり、メチル化ヒストン (H3K4me、H3K27me)、RNA ポリメラーゼ、一部のゲノム高次構造形成因子に関しては既に存在している。小スケールの細胞から、これらの有効な抗体を用いタンパク結合プロファイルの解析が可能はずである。そこで HeLa 細胞を用い感度の高い ChIP-seq 解析が可能系の構築を行った。

免疫沈降を遂行する過程で、最も重要とされるのが超音波処理による DNA の物理的断片化であるが、小スケールの細胞を用いると DNA 断片効率の低下が見られた。原因として容積 (バッファ一量) に対する DNA 量が極端に少ないためにチューブ内での摩擦力が低下し、断片化効率の低下に繋がったと考えられた。そこで、模倣 HeLa DNA としてバクテリオファージ  $\lambda$  DNA を  $2\mu\text{g}$  加えることで断片化効率が向上した。免疫沈降後、 $\lambda$  DNA は IP 分画には含まれず、WCE 分画で混入したものについてはシーケンス後の解析で  $\lambda$  DNA のみ排除することが可能である。この方法により Lysate を作成し、 $10,000$  個の HeLa 細胞でも染色体免疫沈降段階までは ChIP-qPCR により、結合領域が濃縮されていることが確認できた。ChIPed DNA の PCR あるいは、IVT 法による増幅を行い、あらかじめ増幅した DNA を用いてライブラリーを作製し、それをシーケンするという方法を取らざるを得ないと結論し、T7 RNA ポリメラーゼを使用する *in vitro* transcription (IVT) 増幅法を試みた。ChIPed DNA を鋳型とし、大量かつ正確に一本鎖 RNA を合成した後に増幅する方法であり、最もバイアスがかかりにくい増幅法である。

$10^6$  乗、 $5 \times 10^5$  乗、 $4 \times 10^5$  乗の HeLa 細胞を用い抗 H3K79me 抗体による免疫沈降を行い、得られた ChIPed DNA を IVT 法により増幅後、シーケンスを試みた。結果、 $10,000$  細胞においても十分な S/N 比をもつタンパク結合プロファイルを得た (図 1)。H3K79me の結合領域は、 $10^6$  乗細胞や既知の ES 細胞のリファレンスと全体の 93% のピークで一致した。IVT 法による ChIPed DNA の増幅は小スケールにおける微量サンプルの免疫沈降法として最適条件の一つであると言える。

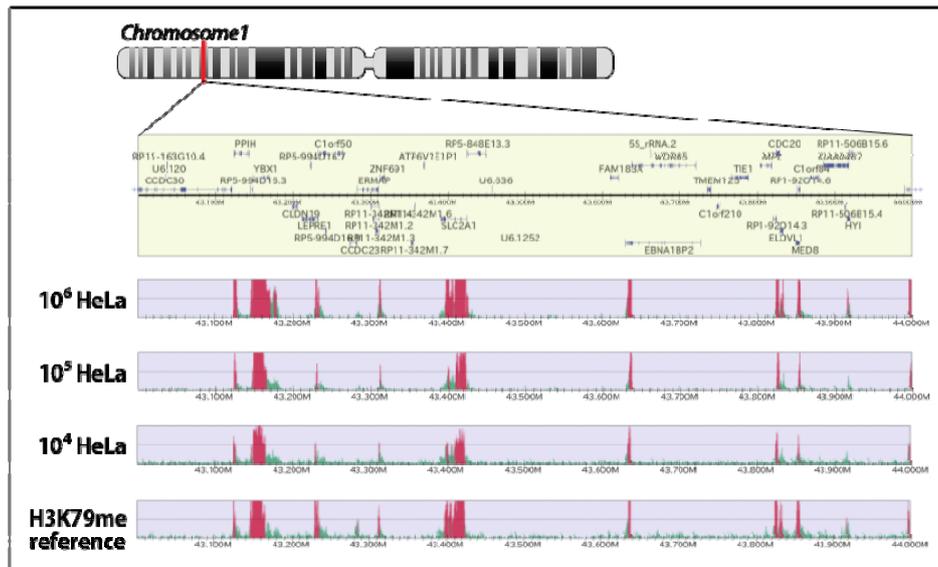


図1 少数細胞からのChIP-seqによるH3K79me結合領域  
(10000個のHeLa細胞からH3K79me結合プロファイルを得ることに成功。)

### ③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発

ヒストン修飾を中心とした微量サンプルのエピゲノム解析のためには、高い特異性と親和性を持ち、かつ再現性が高い抗体が必要である。そこで、本研究では、修飾ヒストン抗体の評価と開発を行っている。まず、修飾ヒストン特異的モノクローナル抗体の親和性を、表面プラスモン共鳴 (BIACORE) により測定した。その結果、H3K4me2 (CMA313)、H3K9me2 (6D11)、H3K27me3 (1E7) 等のメチル化部位特異的抗体の解離定数が 10 nM 程度であるのに対して、H3K9ac (CMA310) は 40 pM、H3K27ac (CMA309) は 1 pM と低い解離定数 (高い親和性) を持つことが明らかになった。また、これらのアセチル化特異的抗体に見られる高い親和性は、非常に遅い解離速度に起因していた。また、生細胞内での抗体の抗原への結合時間を FRAP (光褪色後蛍光回復法) により測定した結果は、*in vitro* の親和性を反映するものであった。すなわち、メチル化特異的抗体は 1 秒程度、アセチル化特異的抗体は数 10 秒の結合時間を示した。これらの結果から、FRAP を用いた解析によっても抗体の親和性に関する指標が得られることが明らかになった。実際、H3K27me3 特異的新規抗体 5G4 は、ELISA や免疫染色において低濃度で抗原を認識したが、FRAP 解析の結果においても、同一の抗原を認識する 1E7 よりも安定な結合性を示した。今後、微量サンプルのクロマチン免疫沈降に適した抗体の基準化を行う予定である。

また、ヒストン H3 に加えて H4 の修飾抗体の特異性と親和性に関して、点変異体や組換え体、修飾ペプチドなどを用いて詳細な解析を行った。その結果、ほとんどの修飾 H4 抗体は近傍のリジンの修飾には影響を受けないが、H4K5ac 特異的抗体 (4A7) は、H4K8 がアセチル化されると反応しないことが明らかになった。H4K5 のアセチル化は、K8 を含めて高度にアセチル化された H4 に起こり転写の活性化に関与するほか、K12 と共に新規に合成された H4 に起こることが知られている。つまり、4A7 は、K8 が脱アセチル化された状態の H4、すなわち新規に合成された H4 を特異的に認識する抗体であると考えられた。実際、4A7 を用いた蛍光免疫染色により、DNA 複製直後のクロマチンが標識され、細胞周期の S 期の細胞の同定に利用できると考えられた。一方、H4K20me1 のレベルは HeLa 細胞などでは細胞周期の G2 期後期に上昇することが知られており、その修飾を特異的に認識する抗体 (15F11) を用いた染色では、G2 後期から G1 初期の細胞が染色された。従って、4A7 と 15F11 を用いた染色により、少数細胞集団における細胞周期の同定が可能となり、これらの抗体は薬効の評価等に応用できると考えられる。

④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発

本テーマの目的は主要なエピゲノム修飾であるヒストン修飾の解析法を確立し、疾患特異的ヒストン修飾解析の基盤技術とすることである。ヒストン修飾の組み合わせコード（アセチル化、リン酸化、メチル化修飾の組み合わせを判定）の包括的プロファイリングを行うため、質量分析法等を用いた解析基盤技術を構築し（図 1A）、主要な修飾組み合わせを微量の検体から検出するハイスループット・高感度定量技術を開発する（図 1B）。

中間目標は、H4 テールプロファイリング技術の確立である。さらに解析によって明らかになった主要な修飾に対する定量技術を確立する。

最終目標は、ヒストン H3、H2 を含めた主要ヒストン修飾プロファイリング解析手法を確立し、研究開発項目③の探索的実証研究で得られた阻害剤候補化合物（図 1C）に用い、標的分子の妥当性を評価することである（図 1）。

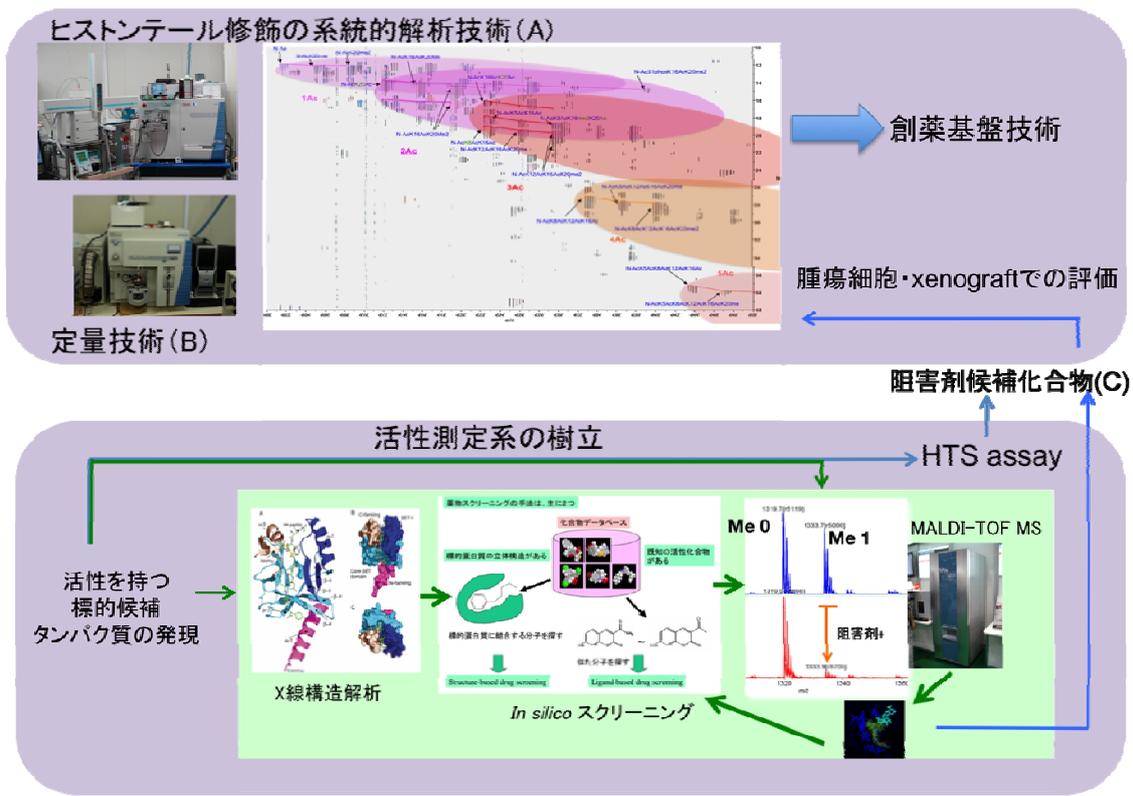


図1 研究開発項目①-(1)-④と研究開発項目③の概要

これまでに解析のために、測定技術（前処理、測定法、修飾分離技術）、解析技術の検討を行いヒストン H4 について修飾のダイナミックな変動を捉えられるようになった（図 2）。

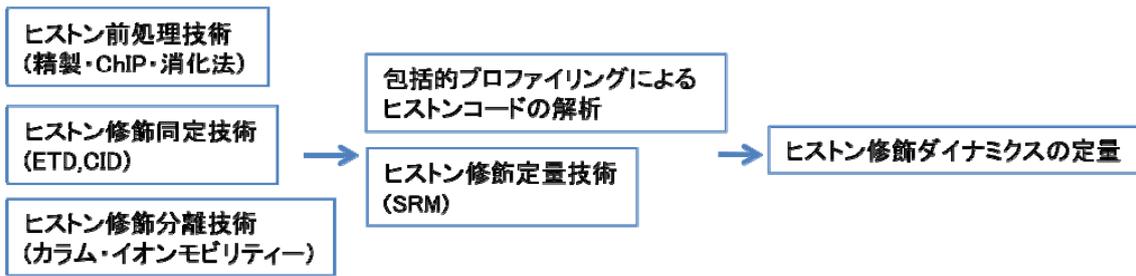


図2 検討項目

ヒストン、特にエピゲノム制御に重要なヒストンテールはリジン (K)、アルギニン (R) 残基を多く含み、一般に質量分析計 (MS) を用いたプロテオミクスで試料の前処理に使われるトリプシンによるタンパク質の特異的アミノ酸残基による断片化では測定出来なくなる。そのためヒストン H4 の解析のためアスパラギン酸残基で切断する AspN を用いた最適化を行った。その結果 H4 テールの主要な修飾を含む断片を得ることに成功した。

上述したようにヒストンは K、R を多く持つため塩基性が高い。塩基性ペプチドは LC-MS で多価のイオンになり、質量の決定は可能だがアミノ酸配列や修飾部位の決定に必須なペプチドを gas を用いてペプチドをフラグメント化し解析する CID (collision induced dissociation) 法を用いた MS/MS では複雑なスペクトルになり解析が困難である。そのため、高精度質量分析計を用いさらに MS/MS の価数を下げて単純化する解離方法 ETD (electron transfer dissociation) 法を用いた測定を行い修飾組み合わせの同定をおこなった。また LC 分離に使用する逆相カラムについても、親水性で保持されにくく、塩基性でテーリングしやすいため、複数のカラムを検討し適した物を選択した。

包括的プロファイリングには LC/MS の結果を二次元ペプチドマップに展開し比較するイオン強度ベースのノンラベル比較定量法を用いた。これらの方法を組み合わせてヒストン H4 テールの経時的修飾変動の解析を行った (図3)。この手法でこれまでに約 80 の H4 テールの修飾組み合わせを検出している (図4)。

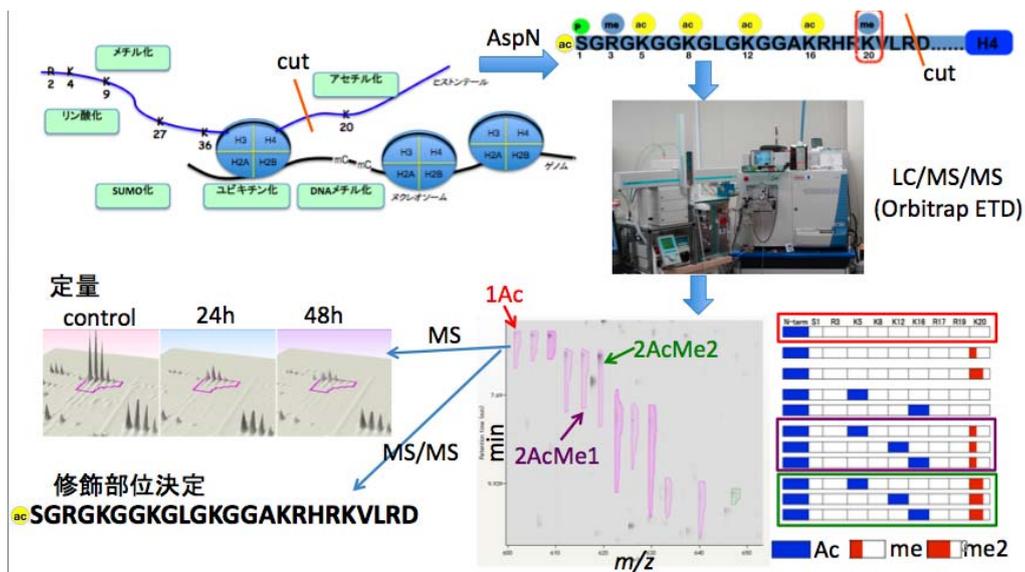


図3 ヒストン H4 テールの解析手法

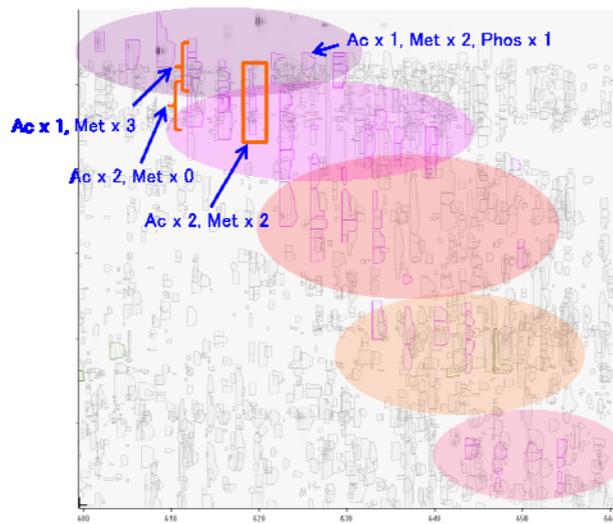


図4 H4 テールの LC/MS/MS の 2D マップ赤四角で囲んだ物が H4 テールの 1 修飾パターン

ヒストン修飾の理論的組み合わせは、H4 だけでも 500 種以上ある。高精度・高分解能質量分析計で ETD を用いてもこれらを完璧に識別するのは困難である。そこで今年度よりさらに高分解能の MS での解析を行い、これまで LC 分離しなければ分別不能だったトリメチル基とアセチル基を MS だけで分離出来るようになった。

LC 分離についても通常用いられる逆相カラムと特性の異なる親水性相互作用を利用した Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) の検討をモデルタンパクで行い、保持を逆転させることで親水性の高いペプチドの保持を高くできた。現在ヒストン解析に使用するための高感度化の条件検討を行っている。

現在同様の手法を用いて、H3 テールコードのダイレクト質量分析解析法の開発を行っており主要な修飾である H3K4 と H3K9 は 1 フラグメント上で検出出来るようになった。

さらに特定の修飾組み合わせをハイスループットに定量するために安定同位体ラベルペプチドを内部標準とした三連四重極質量分析計 (Triple Q-MS) による選択的反応モニタリング (Selected reaction monitoring: SRM) での定量技術の開発に着手した。SRM を ETD で行える MS は現存しないため ETD で得た情報を基に、合成ペプチドを用いた CID での SRM の条件を検討した。これまでにアセチル化部位だけが異なる 4 種の同一質量のペプチドから特定の修飾パターンを持つ物だけを定量的に検出することに成功している。現在さらに高精度、高感度化の検討と、安定同位体ラベルペプチドを用いた絶対定量の検討をおこなっている。

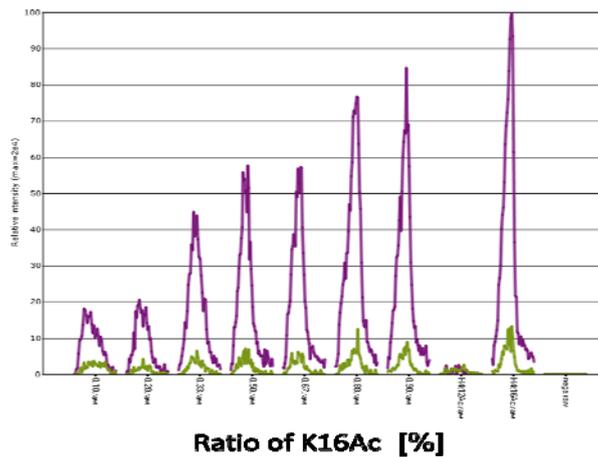


図5 K16Acの比率を変えた4種のペプチドのSRM定量結果  
(混合比率に対応した定量結果が得られている。)

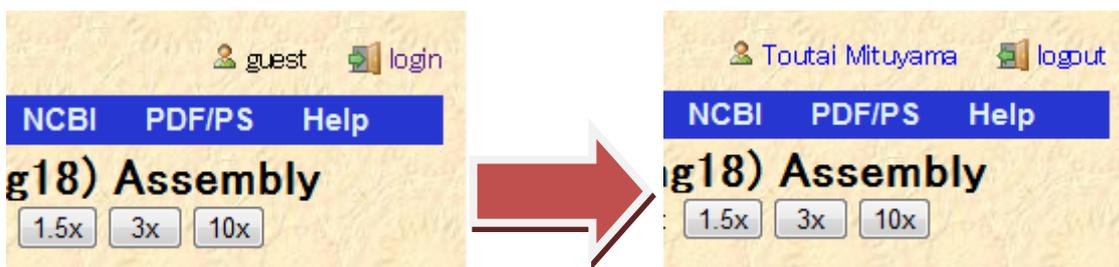
ChIPの手法から精製したヒストンをLC/MS/MSで解析することで特定の修飾を持つヒストンの修飾組み合わせプロファイルを解析するために、ChIPで得られた複合体を脱架橋、ヌクレアーゼ処理してタンパク質を抽出し測定を行った。これまでのタンパク質複合体は検出されておりヒストン解析のための条件検討中である。

後天的ゲノム修飾の中心であるヒストン修飾の解析法を確立することで従来型のH3K9、H4K20など、1つの修飾特異的抗体を用いたChIP-seq等によるデータを複数積み上げて解析する間接的手法だけでなく、主要なヒストンコードの包括的プロファイリング解析系を確立することは、後天的ゲノム修飾の解析の重要な技術となる。

(2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発

① エピゲノムデータベースの構築

UCSC Genome Browser を基盤にして独自の拡張を加えたエピゲノムデータベースを構築している。独自の拡張とは、ユーザー認証機能の追加と、独自トラック情報の掲載である。前者は、プロジェクトメンバーにのみ閲覧可能な秘匿トラック情報の表示に利用する。下図左は未ログイン状態。ユーザー名とパスワードの入力により右側のログイン状態になる。



ログイン状態になることによって、プロジェクト独自で追加したトラック情報を閲覧することが可能となる。プロジェクト独自に追加したトラック情報を次の表に示す。

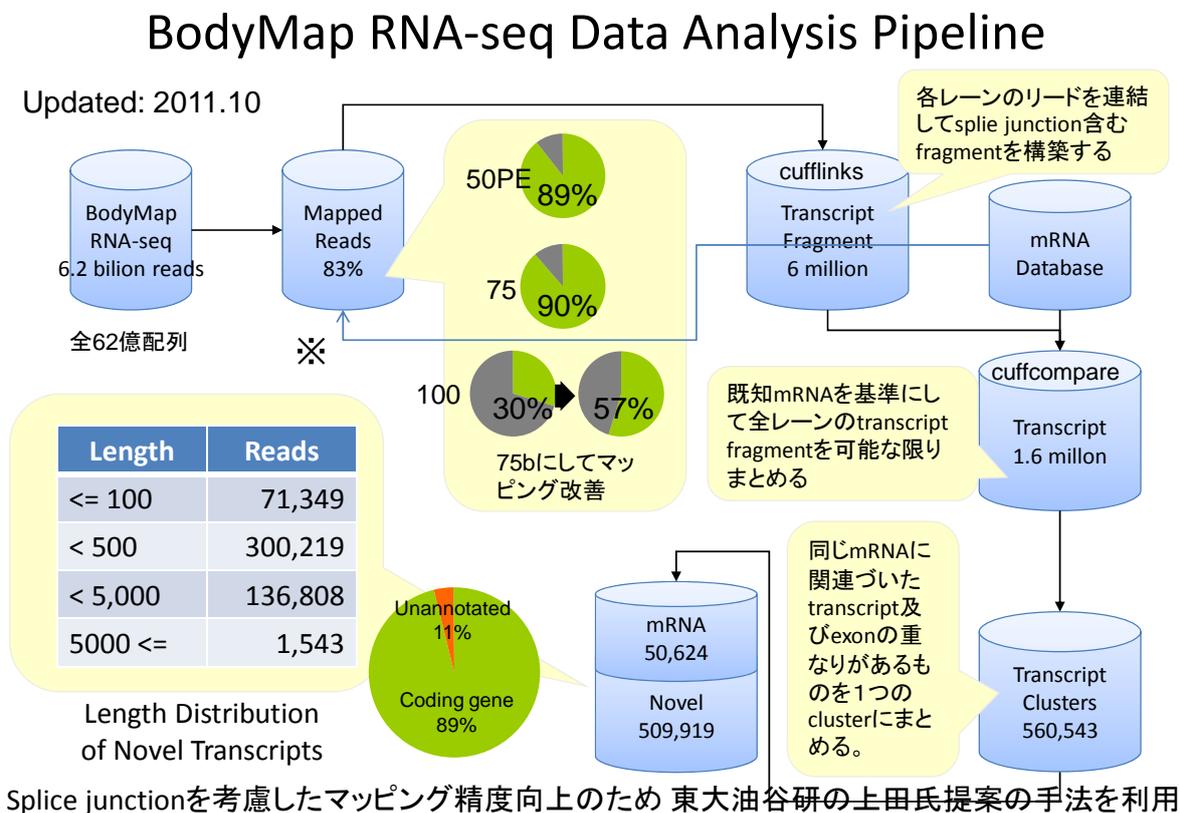
表 独自に追加したトラック情報

Category	Track	Reference
H3K4me3	Khalil2009	Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A, Regev A, Lander ES, Rinn JL. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 14;106(28):11667-72. Epub 2009 Jul 1. PubMed PMID: 19571010
H3K36me3		
lincRNA lincRNA (Polycomb-associated)		
H3K4me3	Guttman2009	Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature. 2009 Mar 12;458(7235):223-7. Epub 2009 Feb 1. PubMed PMID: 19182780
H3K36me3?		
lincRNA (Mouse)		
H3K4me3	Cui2009	Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, Zhao K. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. Cell Stem Cell. 2009 Jan 9;4(1):80-93. PubMed PMID: 19128795
H3K36me3		
H3K4me3	Mikkelsen2007	Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature. 2007 Aug 2;448(7153):553-60. Epub 2007 Jul 1. PubMed PMID: 17603471
H3K36me3		

Category	Track	Reference
lincRNA	Cabali2011	Cabali MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. Genes Dev. 2011 Sep 15;25(18):1915-27. doi: 10.1101/gad.17446611. Epub 2011 Sep 2. PubMed PMID: 21890647
TUCP (transcripts of uncertain coding potential)		
mRNA	cluster (ref)	Illumina Hi-seq 2000 BodyMap 2 RNA-seq
	cluster (no ref)	
	adipose	
	adrenal	
	brain	
	breast	
	colon	
	heart	
	kidney	
	liver	
	lung	
	lymph node	
	ovary	
	prostate	
	skeletal muscle	
	testes	
thyroid		
white blood cell		
poly-A (truncated)	Aburatani Laboratory	
poly-A + Normalization (truncated)		
New RiboFree Method (truncated)		
mRNA	Pancreas Cancer RNA-seq	

② 新規 lincRNA 候補の情報学的抽出

上の表に示した BodyMap と Pancrease Cancer RNA-seq のトラックは、独自の配列解析結果をトラック化して掲載したものである。BodyMap RNA-seq データの配列解析パイプラインの概要を下図に示す。この配列解析パイプラインは新規の機能性 RNA (エピゲノム制御因子の候補として) を検出するために実施した。

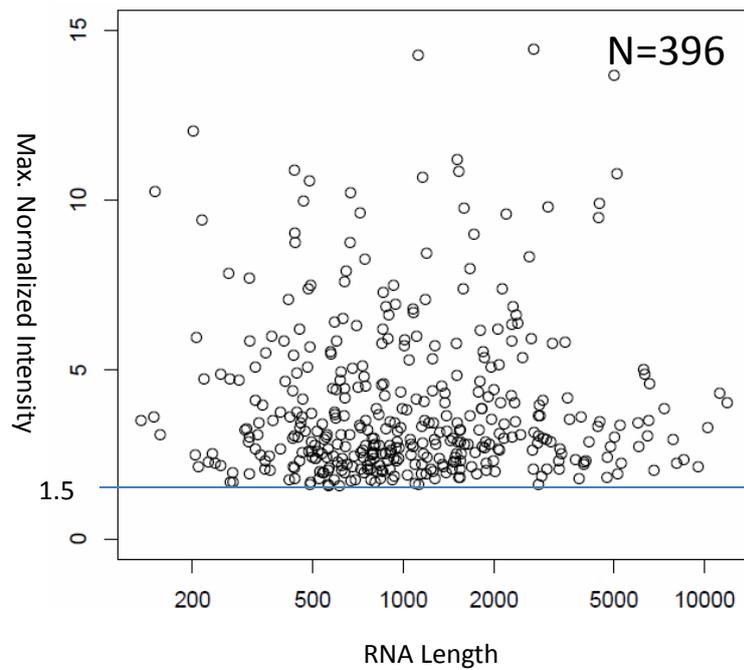


上記のパイプラインによって、既知の lincRNA (long intergenic noncoding RNA) と重複する候補が 2,574 個、新規のもので既知の mRNA でも重複して観測されているものが 66,108 個、まったく新規に得られたものが 109,974 個得られた。これらの中で、150 塩基以上の長さで、発現量の高いもの (Z スコア 1.5 以上) を選別すると、396 個が得られた (下図)。

### ③ エピゲノム情報パイプラインの構築

統合型バイオインフォマティクス・ツールであるGalaxyとデータベースを連携させ、エピゲノムデータを自在に活用するための情報基盤を構築した (<http://epigenome.cbrc.jp/galaxy/>)。 Noncoding RNA解析用パイプラインをこの上に構築し、プロジェクトメンバー間で共有できるようにしている。

## Novel Transcripts (long and high intensity)



## 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

### (1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

#### ① 臨床検体の収集と病理解析

新鮮凍結検体の収集を基本として、長鎖 RNA を含めたエピゲノム解析に耐える品質管理の下に、胃癌、肺癌、肝臓癌について 100 例程度の症例の蓄積を行い、また累積 60 例程度の腫瘍組織から体系的に DNA・RNA の抽出・精製を行った。また高悪性度、難治性腫瘍に対する新規の標的探索という目的に鑑み、肺及び肝臓に関しては、転移、再発を含めたすべての腫瘍性病変のバンキングを行っている。関連する臨床病理学的な情報の整理も行っている。胃癌、肺癌、肝癌以外の癌種も含めてプロジェクトでターゲットとなり得る癌特異的タンパク、核酸の発現評価を迅速に行うための組織アレイの構築を進めている。また組織アレイを用いて修飾ヒストンの正常組織における分布、腫瘍特異的発現の検索を行い、複数の修飾ヒストンについて腫瘍に強い発現を認めた。

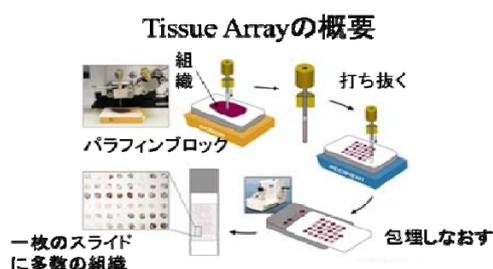
#### (1) 再発、転移を含めた経時的組織バンキング体制の確立

東京大学附属病院胃食道外科、肝胆膵移植外科、呼吸器外科と連携を取り、臨床情報、病理報告書とも連結可能な状態でバンキングを行っている。いずれも、新鮮凍結検体の収集を基本として、長鎖 RNA を含めた解析に耐える品質管理の下に、すでに胃癌、肺癌、肝臓癌について腫瘍部と非腫瘍部について 100 例程度の症例の蓄積を行っている。新たな癌治療薬が続々と開発されており新規症例を継続的にバンキングすることも重要であり継続して症例の蓄積を行っていく予定である。従来の腫瘍組織バンキングは、各臓器の原発腫瘍が多く、比較的低悪性度の腫瘍に偏る傾向があった。これまでの治療では十分に治癒の見込めなかった、高悪性度、難治性腫瘍に対する新規の標的探索という目的に鑑み、腫瘍の転移が高頻度に見られる肺及び肝臓に関しては、転移、再発を含めたすべての腫瘍性病変のバンキングを行っている。

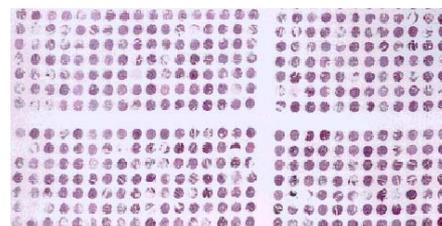
胃癌、肺癌、肝癌に対してそれぞれ 20 例程度（計 60 例）の採取された凍結腫瘍組織から体系的に DNA、RNA の抽出・精製を行った。それぞれについて核酸の精製度・性状・長鎖 RNA の存在を確認するとともに、組織切片の病理学的評価を行って個別に腫瘍含量、組織型の評価を行っている。採取検体の臨床病理学的な情報の整理を行い、本プロジェクトで得られる様々なエピゲノム修飾情報との対応付けが可能な状態とする。品質等の情報は検体採取のプロトコールへフィードバックしている。得られた核酸は東大先端研の集中研グループにおける研究開発項目②に用いている。

#### (2) 組織アレイを用いたタンパク、核酸の評価系の構築

前癌病変、上皮内癌を含めた早期癌、治療前後、再発転移後、死亡時などの経時的変化に対応した組織アレイを構築するのが目的である。組織アレイは、病理組織標本から 2 mm 以下の細い円筒状組織を打ち抜いて、多数の組織を整列させ、一つのブロックに包埋するもので、ハイスループットな蛋白発現局在の分析を行うことができる。



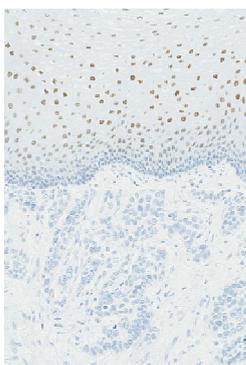
#### 胃癌における組織アレイの作製例



現在すでに、正常臓器（肺・肝臓・腎臓・脾臓・胃・大腸・扁桃・脳・平滑筋・胎盤・羊膜）及びいくつかの腫瘍組織（胃癌、肝癌、肺癌、食道癌、膵臓癌、甲状腺癌、大腸癌）及び対応する非腫瘍部組織について組織アレイを作成している。構築した組織アレイによるタンパク、核酸の評価、及び整理された臨床病理学情報を用いてエピゲノムの標的となるサブグループを特定する。Non-coding RNA など、タンパク質とはならない標的候補については、*in situ* hybridization を用いて様々な癌における発現を解析する予定である。

### (3) 組織アレイを用いたエピゲノム標的のサブグループの特定

大阪大学木村グループ（研究開発項目①-（１）-③修飾ヒストン抗体パネルの開発）より供与された 25 種の修飾ヒストンのモノクローナル抗体を用いて、正常諸臓器（肺・肝臓・腎臓・脾臓・胃・大腸・扁桃・脳・平滑筋・胎盤・羊膜）と腫瘍組織におけるタンパク質の発現と局在を検索した。正常組織を用いた検討では、ヒストン修飾抗体 25 種類（22 修飾部位）のうち、22 種類（20 修飾部位）が、パラフィン切片にて核にコントラストの良い染色性を示した。臓器によって陽性率に差が見られる修飾とどの臓器でもび漫性に陽性を示す修飾が見られた。H3K9ac、H3S10ph、H3K27me3、H3S28ph、H4K12ac などは臓器によって陽性率に差が見られ、特に H3S10ph は、肺、胃、大腸、扁桃、平滑筋、胎盤などでは一部に陽性を示したが、肝臓や脳では陰性であった。扁桃リンパ節では、胚中心、マントル、濾胞間でヒストン修飾の状態が異なっていた。また、各種癌（食道癌 3 例、胃癌 3 例、大腸癌 3 例、肺癌 3 例、肝細胞癌 3 例、膵癌 3 例、甲状腺癌 3 例）を用いたパイロット的検討において、食道癌と肝細胞癌では、一部抗体で食道と肝臓に癌部・非癌部に染色性の差が見られた。胃癌、大腸癌、肺癌、膵癌、甲状腺癌については、検索した症例内では癌部と非癌部で染色性に有意な差は見られず、もう少し多数例での検討が必要と考えられた。肝細胞癌切除 125 例を用いて作成された一部のヒストン修飾に関する TMA での検討では、癌部・非癌部だけで発現に有意な差が見られただけでなく、低分化肝細胞癌ほど発現が高い傾向にあった。



特定の修飾ヒストンに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色の結果の例。食道粘膜正常部（上）に対し、食道癌部（下）は発現が消失していることがわかる。

## ② Xenograft パネルの研究開発

ヒトの癌は、患者個人の遺伝子多型や遺伝子変異、生活環境等の違いに起因する多様性を有し、この多様性は癌の特徴であるとともに、有効な治療法確立の大きな障害となっている。したがって、たとえ同一の癌種であっても、できるだけ多くの癌患者由来の癌について解析することは、ヒトの癌の病態解明には必須である。しかしながら、ヒト癌手術症例から得られる新鮮な検体のみでは採取量に限界があるため、同一症例から塩基配列解析、エピゲノム解析を行い、エピゲノム修飾異常と疾患とを関連づけ、新たな創薬・診断の標的候補分子の同定を行うことは極めて困難である。そこで、手術症例から得られた癌組織を用いて、生体内のヒト癌組織の性質を最も忠実に再現可能なヒト癌組織の直接移植による「direct xenograft」や「培養細胞株」を樹立して利用することが、本プロジェクトで開発されるエピゲノム修飾解析基盤技術を活用して、疾患発症に関わるエピゲノム修飾異常を引き起こす原因分子の探索と検証に有用と思われる。

特に、早期診断が困難な難治性癌である「膵癌」や「スキルス型胃癌」などは、臨床上有用な新規バイオマーカーの発見の意義は大きい。これらの癌は間質成分が豊富で、癌組織に占める癌細胞の割合は少ないため、切除組織を直接解析することは極めて困難で、マイクロダイセクション等を用いて癌細胞を精製・濃縮する必要がある。そのため手術検体試料を用いた解析には、常に量的制限がつかまとう。そこで、これらの癌種を direct xenograft 化することができれば、繰り返し利用可能な標準化されたサンプル供給が可能となり、解析の精度を向上させることが期待できる。

本プロジェクトにおける平成 22 年度の研究計画は、癌と正常の比較解析を行うため、腫瘍組織及び対照正常組織をペアとした臨床検体の収集を行い、膵癌及び胃癌に関して、それぞれ年間 20 例を集め、また、direct xenograft の作製では、膵癌に加え胃癌についても着手し、それぞれ年間 5 例の xenograft 作製を行うことであった。

膵癌及び胃癌に関して、手術後の病理診断後の残りの新鮮な腫瘍組織及び対照正常組織をペアとした臨床検体を収集し凍結保存した。これらの症例は「後天的ゲノム情報と疾患との関連の解明に重要となる」詳細な臨床情報が付随している。また収集した検体の腫瘍組織の一部を用いて、direct xenograft や細胞株の樹立を試みた。平成 22 年度に収集した膵癌の症例数は 35 症例であった(表 1)。胃癌に関しては 47 症例収集した。収集した検体の中には原発巣以外に、リンパ腺転移例や肝転移例も含まれている。また、腫瘍組織及び対照正常組織をペアとした臨床検体の収集は、膵癌及び胃癌で、それぞれ 13 例、34 例であった。

表 1 膵癌及び胃癌の年度別累積症例数と樹立した Direct Xenograft 数

癌種	年度	累積症例数	樹立数	成功率 (%)	腫瘍・正常組織をペアとして収集した累積検体数
膵癌	既存検体	47	13	28	—
	H22	82 (+35)	27	33	13
	H23	133 (+51)	34	26	59 (+46)
	H24*	144 (+11)	34	—	—
胃癌	H22	47	16	34	34
	H23	101 (+54)	21	21	60 (+26)
	H24*	129 (+28)	21	—	—

\* H24 は 4 月末まで

これらのほとんどの検体を用いて、direct xenograft モデルの作製を試みた。具体的には、最大 5mm 角の腫瘍組織片を免疫不全マウスである Nude あるいは NOD/SCID マウスの背部皮下の 3 箇所にも異種移植を行い、移植部位の腫瘍形成の有無を経時的に観察した。腫瘍形成が認められた症例では再移植時に腫瘍の一部を OCT 封入し、急速冷凍後凍結保存した。また 腫瘍の一部は病理標本用にホルマリン固定、さらに組織凍結保存液を用いて凍結保存した。

平成 22 年度に再移植可能となった direct xenograft 症例数は、膵癌では 82 例中 27 例 (33%)、胃癌では 47 例中 16 例 (34%) であり (表 1)、膵癌及び胃癌の症例から、それぞれ 5 例以上の direct xenograft 株の樹立に成功し、当初の研究計画を遥かに上回る成果であった。

加えて平成 22 年度は、研究計画の他に、膵癌患者の腫瘍組織から樹立に成功した細胞株を用いて、3 タイプの肝転移モデル系を樹立した。各タイプは、① 細胞株を皮下へ移植し、いったん固形癌を作り (Indirect Xeno)、これを脾臓内へ移植する方法、② 細胞株を脾臓内へ移植し、その後肝臓へ転移した固形癌を脾臓内へ移植する方法、③ 細胞株を脾臓内へ移植する方法、である。癌の浸潤・転移をより生体に近い形で再現する系としては、組織の移植が優れていると考えられる。一方、細胞株を用いることにより、遺伝子導入や遺伝子ノックアウトが可能となり、転移に関与する分子機構の詳細な解析が期待できる。

平成 23 年度は、平成 22 年度の研究計画を継続し、「新たに膵癌、胃癌それぞれ 5 例ずつの direct xenograft 株の樹立」を試みた。

平成 23 年度に新規に収集した膵癌の症例数は 51 症例で、この中には原発症例以外に肝転移例やリンパ腺転移例が含まれている。胃癌の収集症例数は 54 症例で、膵癌の場合と同様に、この症例数中には 原発症例以外に肝転移例やリンパ腺転移例が含まれている。収集した膵癌及び胃癌の全症例を NOD/SCID マウスの皮下に移植し、腫瘍形成の認められた症例では、再移植時に腫瘍の一部を平成 22 年度と同様に処理して保存した。継代移植の可能になった direct xenograft 症例の総数は、膵癌では 133 例中 34 例 (26%)、胃癌では 101 例中 21 例 (21%) であった (表 1)。また、腫瘍組織及び対照正常組織をペアとした新たな臨床検体の収集は、膵癌及び胃癌で、それぞれ 46 例、26 例であった。平成 23 年度までに樹立に成功した胃癌の direct xenograft の内訳は、「早期癌は、8 例中 3 例 (38%)」と最も効率が良く、次いで「進行癌の非スキルス型が、75 例中 16 例 (21%)」、一方「進行癌のスキルス型は、18 例 2 例 (11%)」と効率は悪かった (表 2)。

表 2 Direct Xenograft 移植を試みた胃癌症例数と組織分類 (平成 23 年度まで)

病理診断	癌研 病院	全国 頻度* (%)	病理組織 診断	肉眼 分類	間質	浸潤 様式	樹立した Xeno 数 (%)
早期癌	8	32		IIa, IIc			3 (38%)
進行癌							
非スキルス型	75	58					16 (21%)
スキルス型	18	10	por, sig	3~4	sci.	INF $\gamma$	2 (11%)
合計	101	100					21 (21%)

「日本の胃癌」 p684 (胃癌研究会)

上記のように、平成 23 年度も、膵癌及び胃癌の症例から新規にそれぞれ 5 例以上の direct xenograft 株の樹立に成功し、研究計画を遥かに上回る成果であった。

樹立に成功した複数例の膵癌及び胃癌の direct xenograft 腫瘍組織標本の病理医による診断の結果、direct xenograft 腫瘍は、継代移植を繰り返しても患者の原発巣の腫瘍の分化度や組織型を極めて良く保持していることが明らかとなった (図 1)。

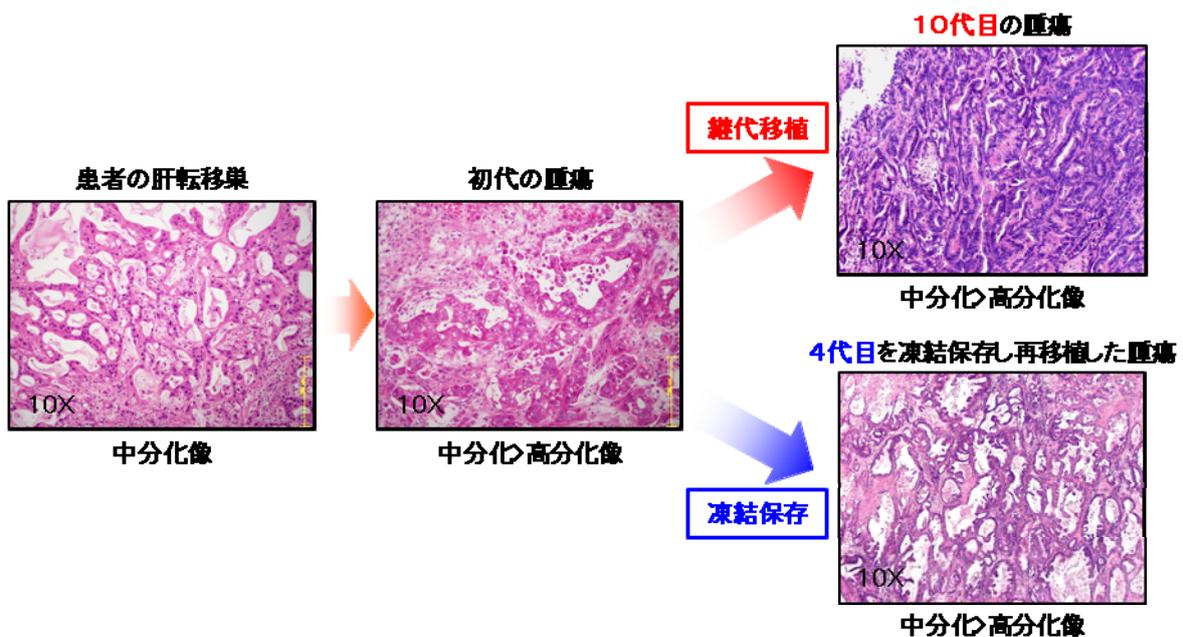


図 1 ヒト膵癌 Direct Xenograft の組織型の維持の確認

一方、direct xenograft 腫瘍組織の「凍結保存と必要に応じた再移植法」が確立できれば、研究の基盤整備は一層向上することが期待される。そこで、「継代移植法」に加えて「凍結保存・再移植法」の検討を行った。組織凍結保存液で保存しておいた 12 種類の膵癌 xenograft 腫瘍組織を融解し、NOD/SCID マウスへ移植後の腫瘍形成能を確認した結果、「移植率は 20 匹中 19 匹の 95%」で、「生着率は 57 箇所中 48 箇所の 84%」と高率であった。また、病理医による再移植の腫瘍組織標本の診断の結果、患者の原発巣の腫瘍の分化度や組織型を保持していることも確認された (図 1)。

非スキルス型の進行胃癌から樹立された direct xenograft の腫瘍の組織構築を、ヒト及びマウスの MHC クラス I 抗原に対する抗体を用いて免疫染色した結果、継代移植 1 回目の腫瘍の免疫染色パターンは表裏の関係が認められ、ヒトの間質は早い段階でマウスの間質に置換されていることが明ら

かとなった (図 2)。これらの免疫染色の結果は、「xenograft 腫瘍が患者の原発巣の病理組織像を保持していたのは、組織を支持する間葉系の間質がヒトからマウス細胞へ置き換わって組織構築が維持されていた」ことを示している。一方、スキルス型の進行胃癌から樹立された direct xenograft の腫瘍は、間質の増生は著しく、ヒトとマウスの抗体による染色パターンは非スキルス型の進行胃癌ほど明確ではなかった (図 2)。この染色結果は、スキルス型胃癌組織からの癌細胞の精製・濃縮は、マイクロダイセクション法ではなく、ヒト抗原に対する特異的な抗体を用いたパニング法などの方が効率的であることを示唆している。

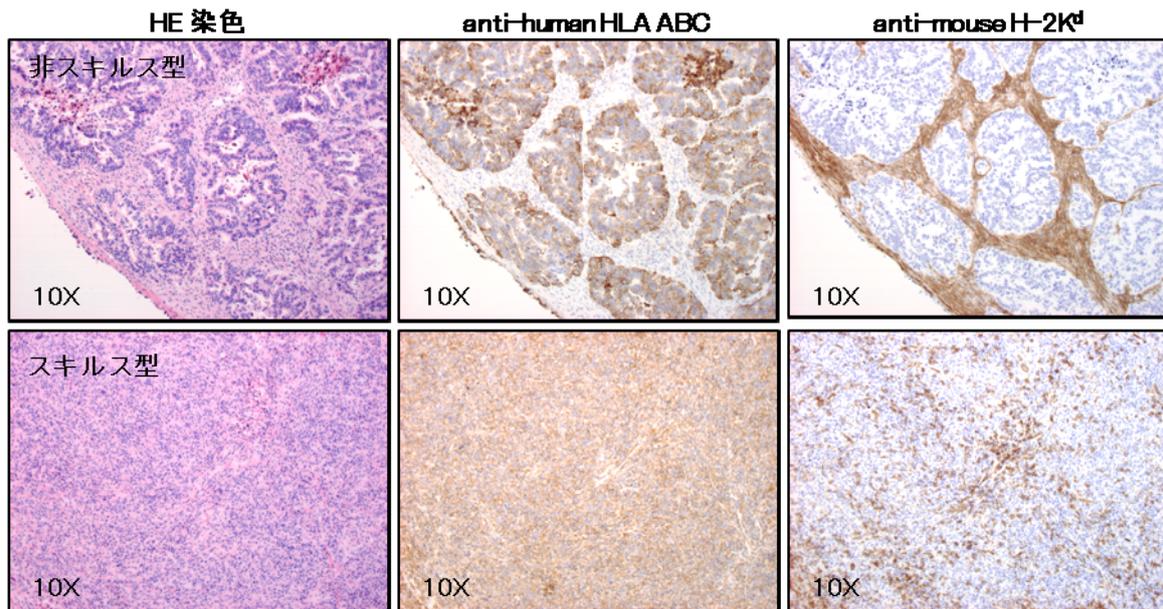


図 2 ヒト進行胃癌 Direct Xenograft の組織構築

一方、ヒト膵癌の xenograft 腫瘍の染色パターンは、非スキルス型進行胃癌の場合と同様に明確であり、ヒトの間質は早い段階でマウスの間質に置換されていることが確認された。

平成 24 年度の研究計画は、「膵癌及び胃癌について、新たに 5 例ずつの direct xenograft 株の樹立を行い、加えて Xenograft 組織におけるトランスクリプトーム及びエピゲノム解析を進め、原発腫瘍組織とのエピゲノム修飾の比較について検討を行う」ことである。

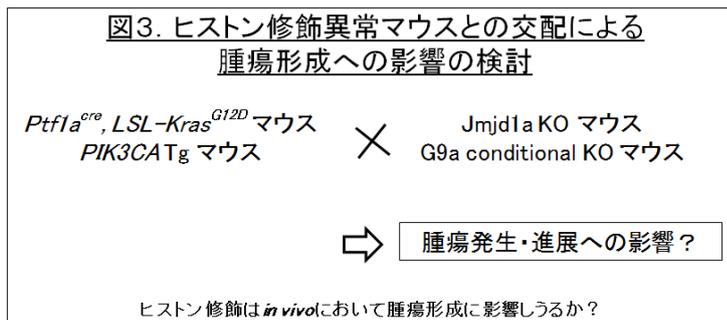
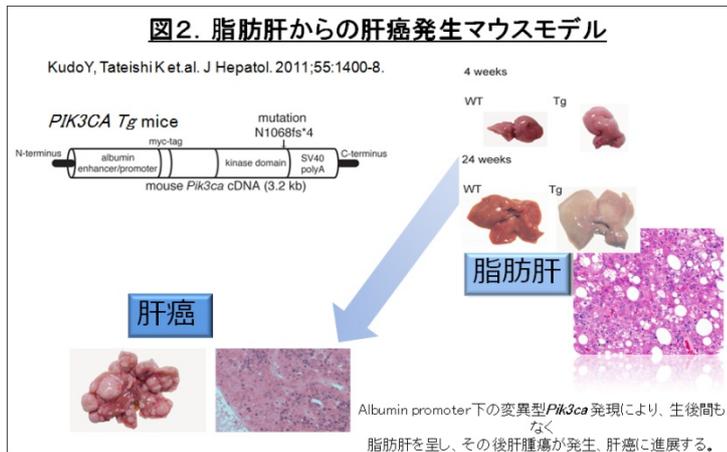
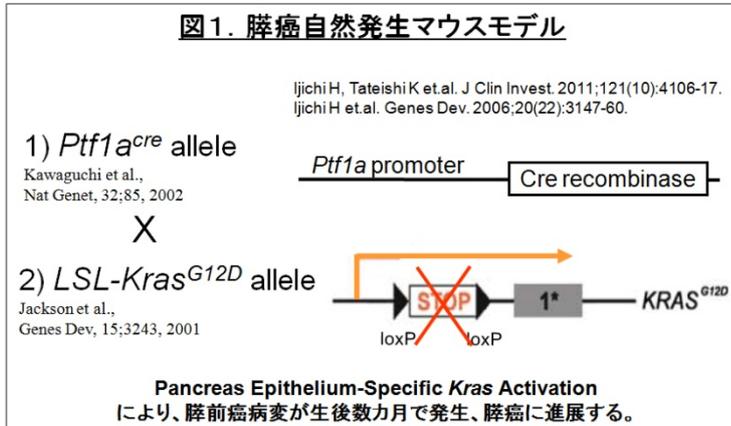
新たな xenograft 腫瘍株を樹立するために、年度初めより精力的に検体の収集と詳細な臨床情報の取得を行っている。今年度 4 月末までの検体の収集は、膵癌では原発巣が 6 症例、リンパ節や肝臓への転移は 5 症例で、計 11 症例であった。一方、胃癌では原発巣が 18 症例、リンパ節及び肝臓への転移は 10 症例で、計 28 症例であった (表 1)。これら症例のすべてを、NOD/SCID マウスの皮下へ移植し、現在、腫瘍形成の有無を経過観察している。また、患者の原発癌組織、direct xenograft 癌組織、及び培養細胞株のトランスクリプトーム解析については着手し始めているところで、今後、ゲノム・エピゲノム解析も加え、プロファイリングとデータベースの構築を行う。これらの解析から得られる情報は、詳細な臨床情報が付随する同一癌組織の手術材料を起点としているため、極めて独自性が高く、direct xenograft マウスの腫瘍組織が、ヒト癌組織のモデルとしての妥当性が確認できれば、臨床応用へとより一層付加価値が高まる。ヒト癌組織の直接移植による direct xenograft とそこから得られる培養細胞株、さらにそれぞれのトランスクリプトーム情報及びゲノム・エピゲ

ノム情報を有する研究リソースは、薬物治療法の治療効果のバリデーションをはじめ、新たな分子機能の解明、あるいはバイオマーカーや癌治療分子標的の同定等に結びつくことが期待される。

③ エピゲノム変異発癌モデルの研究開発

A) 既存癌モデルの解析

肝癌や膵癌を自然発生する遺伝子改変マウスを用いて、ヒストンメチル化及び脱メチル化が、癌発生にどのような役割を持つのかを検討した。



発癌モデル実験に用いるマウスを得るため、膵癌 (*Ptf1a<sup>cre</sup>, LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>*) 発症モデル (図1) あるいは肝癌 (*PIK3CA-tg*) 発症モデル (図2) マウスと条件的 *G9a* 欠損マウスの交配を開始した (図3)。今後、必要な数の *G9a*+ あるいは - の肝癌/膵癌発症モデルマウスが揃い次第、癌発症率と悪性度評価、生存率、癌組織のエピゲノム解析を実施する。

B) 新たな癌モデルの開発とその表現型のエピゲノム解析

PR (PRDI-BF1 and RIZ) ドメインタンパク質 (PRDM) は、PR ドメインと zinc-finger ドメインを持つ分子ファミリーで、PR ドメインはヒストンリジンメチル化活性を持つ SET ドメインとも相同性を有することから、SET ドメインサブファミリーと分類されることもある。実際、PRDM のいくつかはヒストンリジンメチル化活性を示す。

近年の解析から、PRDM はさまざまな細胞の運命の決定に重要な役割を果たすこと、さらに癌細胞において、その発現が消失することが報告されている。PRDM5 は、さまざまな種類のヒト癌細胞にお

いて、その発現が抑制されていることが知られている分子で、PRDM5 を PRDM5 陰性の癌細胞に強制発現させると、細胞増殖を阻害することも報告されている。

新たな発癌モデルの開発とその表現型のエピゲノム解析のため、PRDM5 コンディショナル KO マウス作成を開始し、目的とする変異を持つマウスラインを得た。さらに、外来性の Flag-Prdm5 をマウスの NIH3T3 細胞に恒常的に発現させた細胞株を樹立し、抗 Flag 抗体を用いた Flag-Prdm5 の ChIP-seq 解析を行った。

#### ④ エピゲノム修飾の特異性を規定する非コード RNA 機能の研究開発

近年、ポストゲノム解析によって発見された長鎖非コード RNA が、クロマチンのヒストン修飾の特異性を規定する可能性が浮上し注目を集めている。これまでに特定の非コード RNA が、遺伝子のサイレンシングを引き起こすヒストンメチル化転移酵素複合体 PRC2 と RNA-タンパク質複合体を形成すること、また非コード RNA の働きによって PRC2 が特定の標的遺伝子クロマチン領域に作用できることなどが明らかにされ、非コード RNA はエピゲノム制御の特異性を規定する重要な役割を果たしていることが明らかになってきた (図 1)。さらに、特定の非コード RNA の異常発現によって、数百のタンパク質遺伝子領域のヒストン修飾パターンがリプログラミングされ、その結果として乳癌細胞の高い転移能が獲得されることも明らかになった。こうしたことから、非コード RNA を介したエピゲノム修飾機構の破綻が、癌化、癌の病態変化に極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆される。さらに、エピゲノム制御を標的とした医薬品開発を目指す上で、エピゲノム制御の特異性を規定する非コード RNA の作用機構の解明は重要である。こうした背景において、これらの長鎖非コード RNA の中から重要なエピゲノム制御を司る非コード RNA を同定し、その作用機構を解明することを目標に以下の 3 つの解析を実施した。

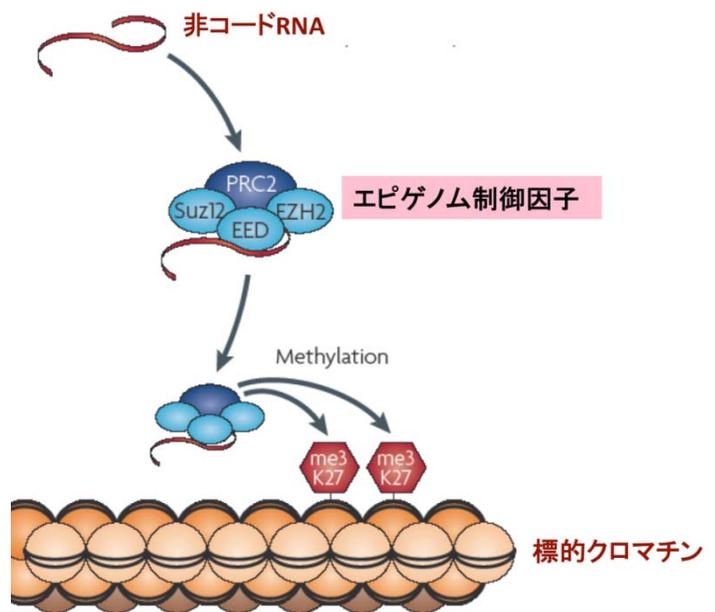


図 1 非コード RNA によるエピゲノム制御の特異性規定モデル

#### (1) 長鎖非コード RNA 探索システムの構築

非コード RNA の中から癌病態を司る重要な非コード RNA を探索するために、各非コード RNA 領域の特定と発現変動検出システムの整備を行った。ヒトゲノム上には極めて多くの転写物がマッピングされていたが、それらの RNA としてのアイデンティティの整備はあまり進んでいなかった。そこで、今後の様々な解析により、注目する非コード RNA のセットを確定することが重要と考えた。まず非コード RNA 領域の特定には、東大先端研の次世代シーケンサー (HiSeq2000) による RNA-seq データをもとに各非コード RNA の転写領域を類推し、その周囲のヒストン修飾パターンなどのエピゲノム情報を統合し、最終的にリボソーム RNA などの既知 RNA とのオーバーラップを除くことによって非コード RNA 領域を確定した。

さらに、これらの非コード RNA の発現変動を検出するために、転移能の異なる 2 種類の関連した大腸癌細胞株の RNA-seq 解析を実施し、両細胞株から約 3 億リードの RNA 配列情報を得た。その配列情報から約 25,000 個の非コード RNA 領域を特定し、近傍のタンパク質遺伝子の位置関係により、3 つのカテゴリーに分類した。そのうえで、2 つの細胞株間で顕著に発現変動する非コード RNA を選別した (図 2)。これらの非コード RNA は、各癌細胞の特徴を規定するエピゲノム制御因子である可能性があり、今後機能解析を実施する予定である。

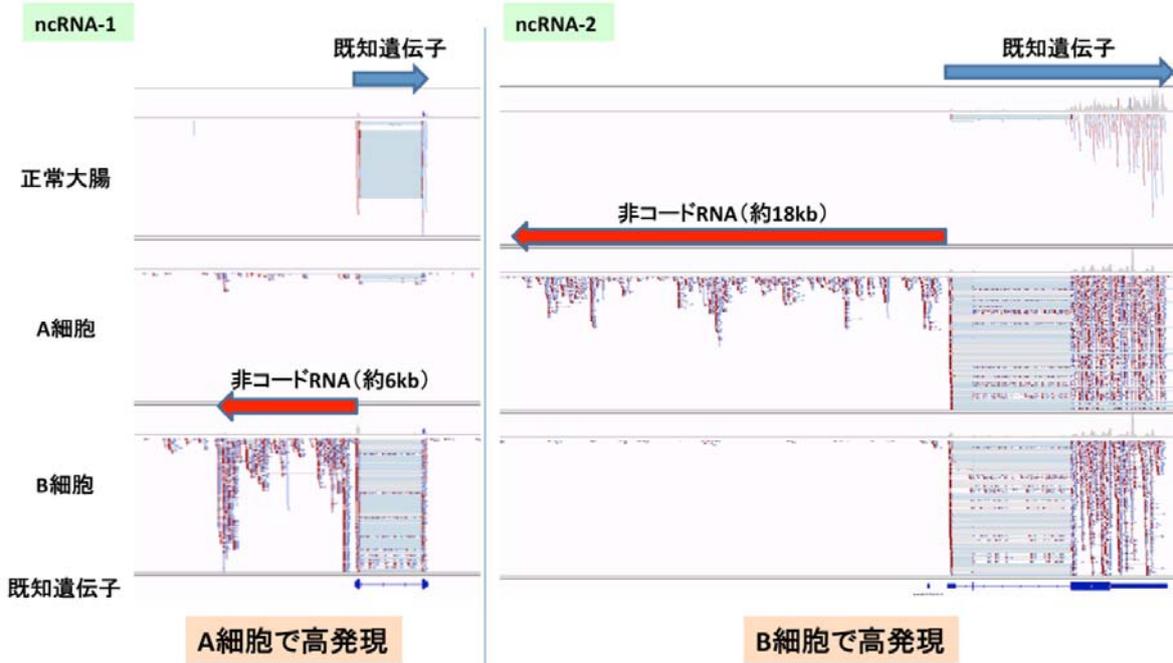


図 2 2 種類の大腸癌細胞株間で顕著に発現変動する非コード RNA の例。

(2) 非コード RNA 制御因子機能に注目した RNA-seq 解析

非コード RNA の多くは、mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写されるが、mRNA とは対照的に細胞核内に局在し機能している。そこで核内に存在する非コード RNA 群の発現をグローバルに制御している因子を同定することを試みた。そしてそれらの非コード RNA 制御因子を人為的に機能破壊した際の非コード RNA 群の発現パターン変化及びそれに

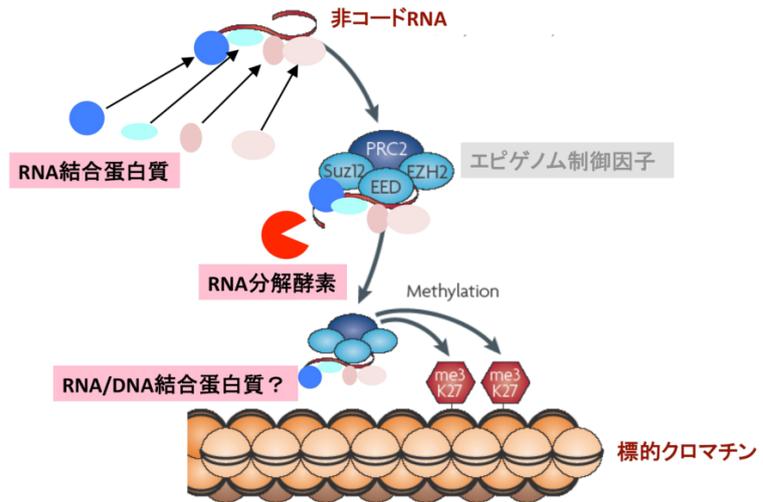


図 3 非コード RNA の発現/機能を制御する因子

伴うゲノムワイドのクロマチンヒストン修飾パターン変化を解析することを目指している。非コード RNA 制御因子としては、非コード RNA に相互作用する RNA 結合タンパク質や非コード RNA の分解酵素などが候補として考えられた (図 3)。まず非コード RNA の安定化制御、特有の生合成機構に関わる因子を同定するために、本チーム所有のヒト核内の RNA 制御因子の RNA 干渉ライブラリーを用いて、乳癌細胞の転移能獲得に関わる非コード RNA をモデル RNA としてスクリーニングを行い、この非コード RNA の安定性制御に関わる RNA 分解酵素、さらにこの非コード RNA の生合成に関わる RNA 結合タンパク質を同定した。RNA 分解酵素を RNA 干渉によって機能阻害すると、多数の非コード RNA の蓄積量が著しく上昇することが明らかになり、これらの非コード RNA は、通常この RNA 分解酵素による分解を受けて低レベルに保たれていることが明らかになった。

一方、非コード RNA の生合成に関わる RNA 結合タンパク質を RNA 干渉で機能阻害したところ、非コード RNA の長さの異なるアイソフォームが産生することが明らかになり、非コード RNA の発現には量的な変動だけでなく、質的な変動も頻繁に起こっていることが示された。また、こうした産生アイソフォームの変化によって、この非コード RNA の既知標的 mRNA の発現が変化することも確認された。こうした基礎データをもとに、RNA 分解酵素による非コード RNA の分解制御及び RNA 結合タンパク質による RNA 生合成制御についての網羅的な情報を得るために、各 RNA 制御因子を RNA 干渉によって機能阻害した細胞を調整し、それらの細胞の RNA-seq 解析を実施し、現在そのデータから、上記制御を受けている非コード RNA の情報を収集している。さらに、非コード RNA 群がグローバルに量的または質的に発現変動した際の、タンパク質遺伝子の発現変動を同時に解析している。

### (3) 新たな非コード RNA 制御因子の解析

非コード RNA に結合するエピゲノム制御因子としては、PRC2 のようなポリコーム複合体が知られていたが、その後ポリコームと同様に遺伝子発現の抑制方向に作用するヒストン脱メチル化酵素複合体、さらには遺伝子発現の活性化を司るトライソラクス複合体が結合し、その複合体の標的特異性を非コード RNA が担っている可能性が示されている。さらには、ヒストン修飾以外のエピゲノム関連因子の多くが非コード RNA と複合体を形成するという報告もある。そこで、様々な癌の腫瘍抑制能を有するクロマチン再構築因子複合体が、非コード RNA と相互作用してお互いの機能を制御している可能性を見出した。この複合体は、これまでに研究してきた核内構造体 (PNAS 2009, JCB 2011) に局在し、この構造体を形成する非コード RNA と相互作用することが明らかになった (図 4)。また、このクロマチン再構築複合体が、非コード RNA 依存的な核内構造体の構造構築に必須であることも明らかになった。よってクロマチン再構築複合体が非コード RNA 機能をモデュレートしている可能性が浮上した。またこの核内構造体を通してクロマチン再構築複合体の作用が制御されている可能性も考えられた。今後、これらの可能性を検証し、新しい非コード RNA によるエピゲノム制御機構を解明することを目指す。

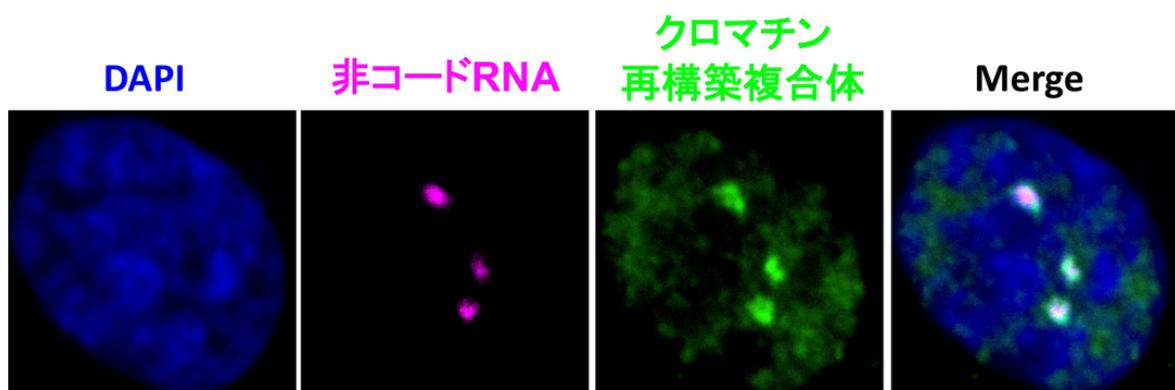
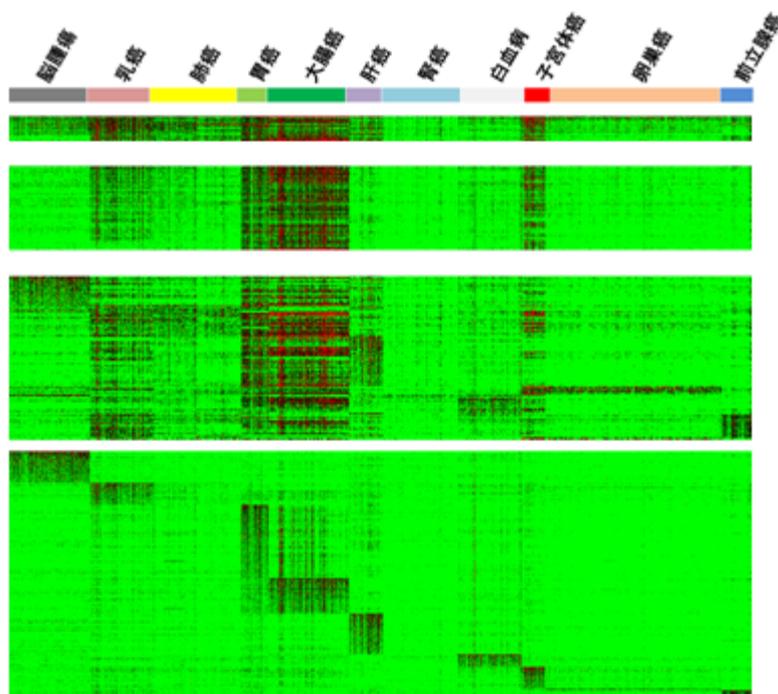


図 4 非コード RNA とクロマチン再構築複合体との共局在の検出。

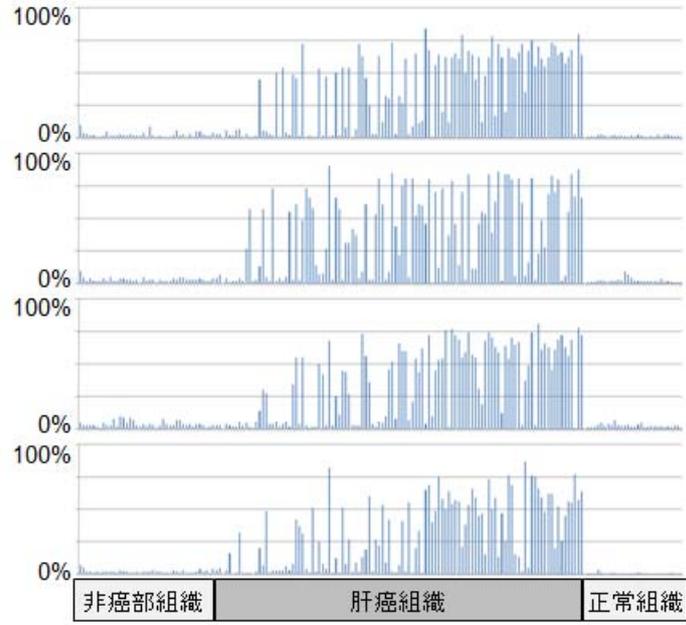
### ⑤ 癌診断メチル化マーカーに関する研究開発

広く様々な癌腫を検出する早期診断マーカーを探索する目的で、当施設で取得した 27K エピジェノタイピングアレイのデータと、北米で実施されている TCGA プロジェクトおよび論文で公開されているデータをまとめ、11 癌腫の癌部組織 2,252 例（脳腫瘍 283 例、乳癌 186 例、肺癌 260 例、胃癌 82 例、大腸癌 236 例、肝癌 100 例、腎癌 235 例、白血病 188 例、子宮体癌 70 例、卵巣癌 519 例、前立腺癌 93 例）および非癌部組織 464 例、各種ヒト正常組織 19 例、正常血液 93 例のメチル化プロファイルを作成した。



これを用いて、非癌部組織、正常組織、正常血液では検出せず、癌部組織では異常メチル化を示す CpG 領域のパネルを上図のように作成し、これらの中から陽性率の高いものを、MassARRAY 法および MSP 法で確認を行った。その結果、20 種類の癌腫特異的マーカー候補（脳腫瘍 3 マーカー、乳癌 1 マーカー、大腸癌 2 マーカー、肝癌 7 マーカー、白血病 2 マーカー、前立腺癌 1 マーカー）と、24 種類の複数の癌腫で陽性となるマーカー候補で良好な結果を得たため、これらを次の段階の血液で検証する候補遺伝子とした（特許出願中）。

以下に、肝癌特異的なマーカーのそれぞれの臨床組織におけるメチル化率の実例および、脳腫瘍、乳癌、肝癌、子宮体癌で見出したマーカー候補の陽性率を示す。上記の 20 種類の癌腫特異的マーカーに関しては、非癌部組織および他癌腫でも陽性にならないものであり、これらが検出された場合には癌の存在に加えて、癌腫の特定を同時に行うことができる利点がある。

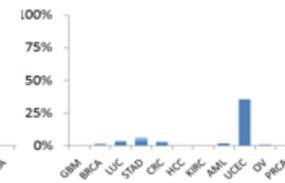
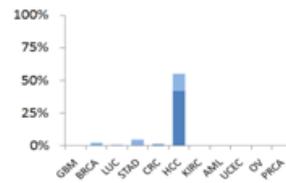
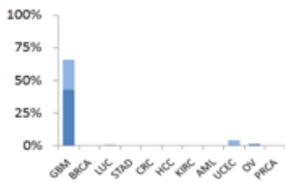
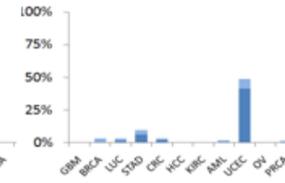
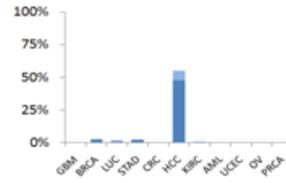
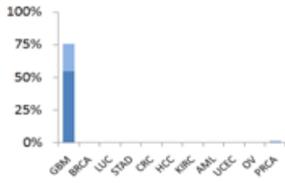
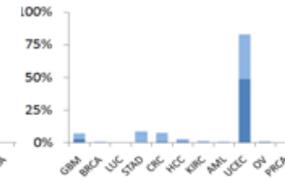
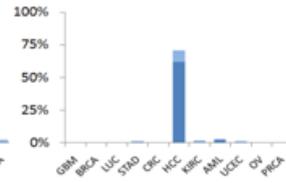
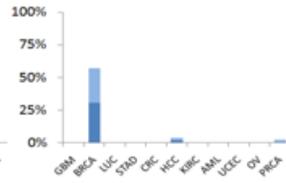
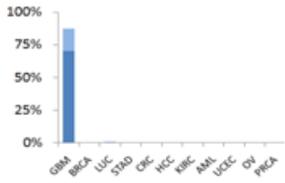


腦腫瘍

乳癌

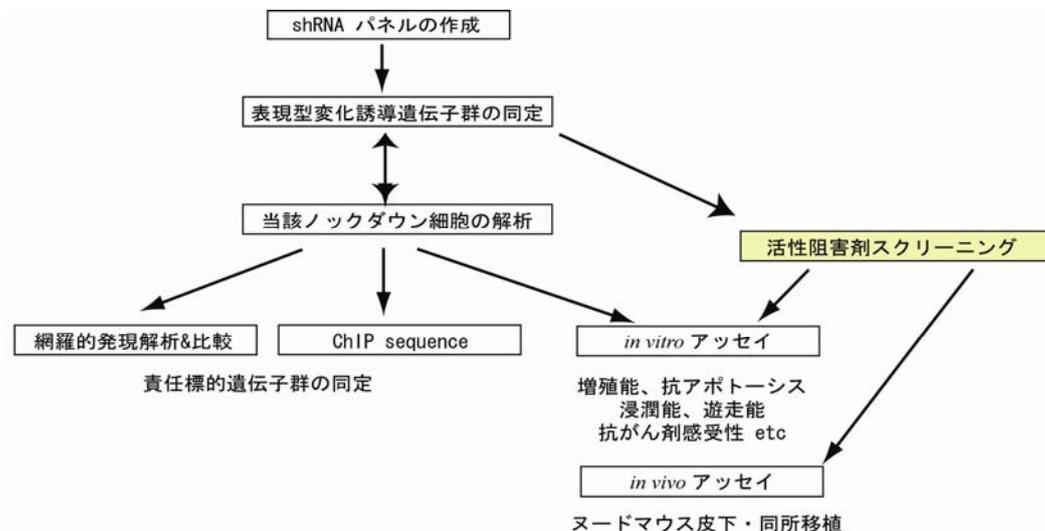
肝癌

子宮體癌



## ⑥ 癌細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発

本研究開発は、新たな創薬開発の標的分子候補に対するターゲットバリデーションの一端を担うべく、様々なヒストン・DNA 修飾酵素遺伝子群に対する shRNA をデザイン・作成し、それを細胞に導入することで誘導される表現型変化のスクリーニングと、さらにはその分子メカニズムを解析することで、将来の阻害剤スクリーニングに役立つ基盤情報収集を行うものである（下図）。



これまでの成果として、ヒストンメチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素およびクロマチンリモデリング因子などの中から順次 shRNA 配列をデザインし、レンチウイルスベクターに搭載した。200 種類以上の癌細胞株の発現プロファイルデータに基づき、それぞれ標的とする遺伝子の発現が比較的高い癌細胞株をウイルス感染に用いた。これまでに約 10 種類の分子について各々の shRNA を安定に発現する大腸癌細胞、膵癌細胞を樹立してきた。コントロール細胞との比較により、shRNA によるノックダウンに伴う細胞の表現型の変化を、*in vitro* においては増殖能、浸潤能、薬剤感受性などを指標に検討した。また *in vivo* における作用抑制による影響を評価するために Tet システムによる誘導型の shRNA 発現ベクターを用いた、抗腫瘍効果の評価系を構築した。このシステムを用いることで、*in vivo* において腫瘍内の酵素活性を抑制することにより腫瘍組織に起きる影響を解析可能とした。

以上の解析の結果として、様々なヒストン修飾酵素遺伝子群は、それぞれが細胞の悪性度に正あるいは負の影響を及ぼしていることを見出してきた。そのうち、細胞の悪性度がノックダウンによって低下する遺伝子については治療標的候補になりうることを考え、分子メカニズムの解析を含めた研究を進めている。

その一例として、*KDM4C* 遺伝子発現の抑制が大腸がん細胞の腫瘍形成能の低下を引き起こすことを明らかにした。

*KDM4C* 遺伝子は、その増幅が食道癌や乳癌で報告されているヒストン H3 の 9 番目リジン(H3K9)の脱メチル化酵素 *KDM4C* をコードする。その分子が大腸癌組織の腫瘍部で高発現していることを見出し、安定ノックダウン大腸癌細胞株を樹立した。

ノックダウン細胞は *in vitro* における腫瘍形成能の低下を呈し(図1)、ノックダウン細胞に *KDM4C* を強制発現させるレスキュー実験にて腫瘍形成能が回復したことから、*KDM4C* の酵素活性の抑制が抗腫瘍効果をもたらす可能性を示唆していた。

また膵癌細胞株においても同様の腫瘍形成能の低下が再現されたことから、この酵素活性の抑制

が複数の癌腫で腫瘍形成能に効果をもつ可能性が示唆された。

さらにマイクロアレイを用いた発現解析から、ノックダウンにより発現変化を認めるおよそ 400 遺伝子を抽出した。現在までに、それらの遺伝子のうち今回の腫瘍形成能の低下に関連する標的遺伝子候補を同定しており、その分子のノックダウンにより腫瘍形成能の低下が再現されることを確認した。

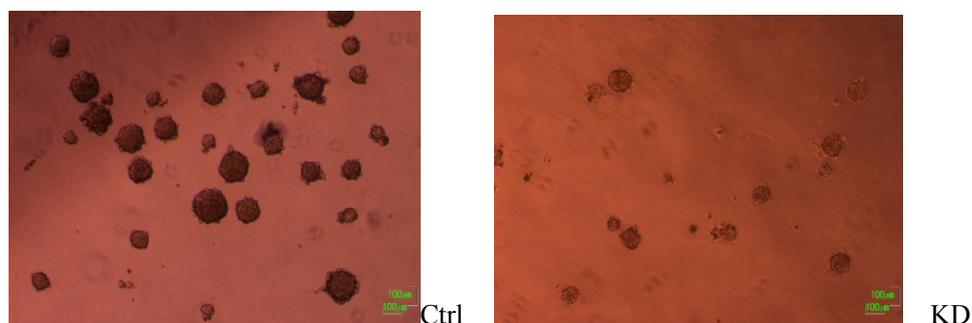


図 1 Sphere 形成能の比較

今後も KDM4C のみならず、癌治療標的候補として、メチル化酵素、脱メチル化酵素その他を併せて 11 種類の創薬標的分子候補を抽出している。

ヒストン修飾酵素遺伝子群については、発現タンパクを用いた酵素活性測定系の構築を進めている。構造解析を目的とした標的候補酵素のタンパク大量精製に着手する一方、特異的モノクローナル抗体の作成、質量分析によるタンパク複合体解析、非天然結合ペプチドスクリーニングを展開している。すでに標的候補タンパク分子の三次元構造が知られている場合は、研究開発項目③の計算科学による阻害活性を有する低分子化合物のデザインおよび阻害活性の検証へと進めた。

### 研究開発項目③「探索的実証研究」

(1) 「後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発」では研究開発項目①で開発しているヒストンテール修飾の系統的解析技術を用い、先行研究および研究開発項目②より明らかになった標的分子で制御されるヒストン修飾の解析を行う。また (2) 「探索的実証研究」で得られる化合物を用いた評価に用いるための主要なパターンについて、再現性よく定量的に解析する手法を開発する。さらに標的分子の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングする目的で多数の試験サンプルに対して適応可能な、高感度かつ高精度なハイスループットアッセイ (HTS) 法を構築する。

(2) 「探索的実証研究」では、構築したHTS法と*in silico*スクリーニングを併用して標的分子の酵素活性を阻害する化合物の探索を行い、得られた化合物を用いて研究開発項目①、研究開発項目③の技術でヒストンテール修飾の系統的解析を行い、標的分子の妥当性の評価を行う (図1)。

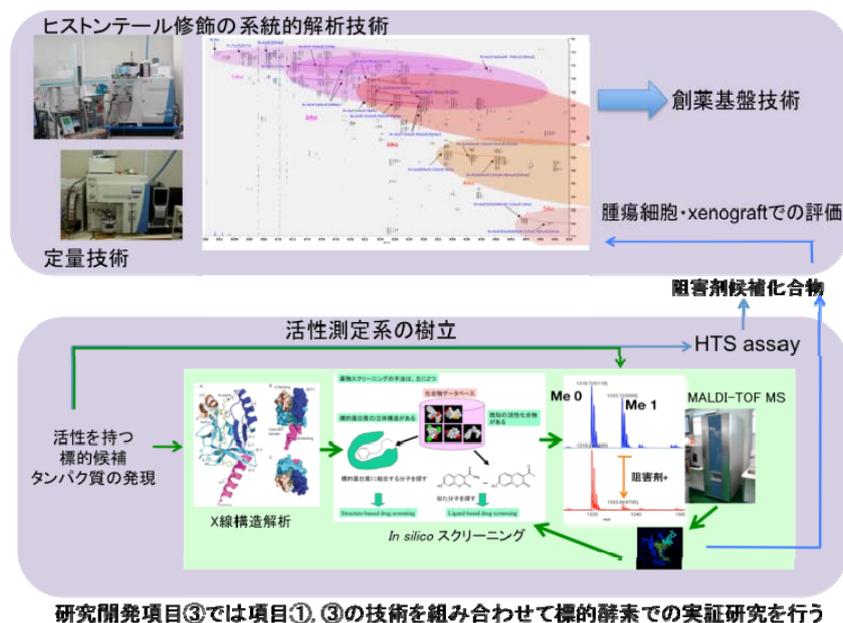


図1 研究開発項目③の流れ (36 頁図1 の再掲)

(1) 後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発

研究開発項目①で開発した質量分析計によるヒストン修飾の組み合わせコード解析技術を用いて、H4K20モノメチル化酵素 PR-SET7 の関与が報告されている細胞周期でのヒストン H4 テール修飾プロファイルの経時的変化の解析をおこなった。その結果プロテオーム解析においても既報と同様に G2/M 期での H4K20me1 の上昇が観察され、解析系の妥当性が示された (図2)。

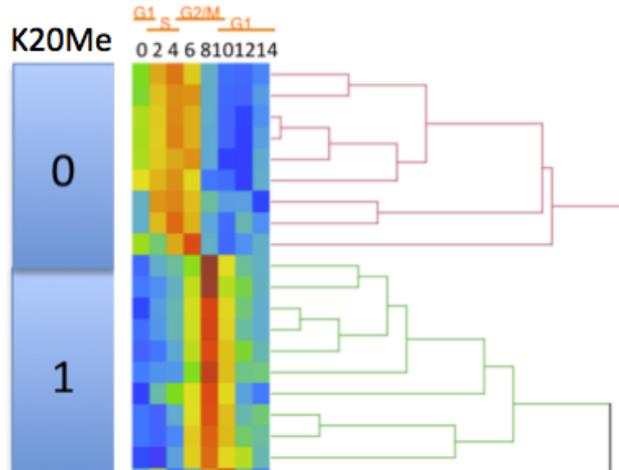


図2 細胞周期でのH4 テールの修飾変化  
(K20 モノメチルとメチル化無しの修飾を含む物を示している。G2/M 期でモノメチルを含むH4 テールの発現の上昇が見られる。)

この解析で、アセチル基を2箇所、メチル基を2箇所もつH4 テールの存在量が多いことが明らかになった。H4 テールはN末端の他、K5, 8, 12, 16の4箇所がアセチル化される。そこで、それらの4ペプチドを合成し三連四重極質量分析計を用いた選択的反応モニタリング (Selected reaction monitoring:SRM) 法での個々のペプチドの定量を試みた (図3)。

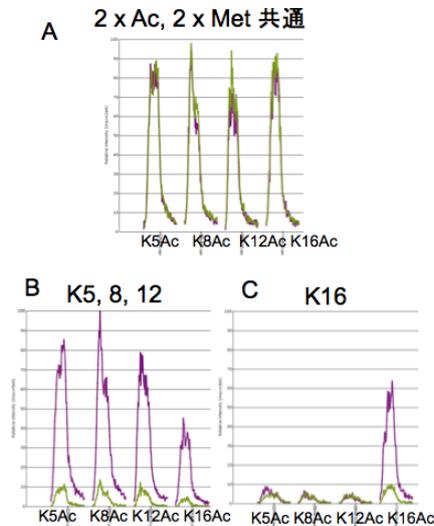


図3 SRM法による比較定量  
(K16Ac を特異的に検出するトランジションが決定出来ている。)

SRM法では、個々のペプチドを定量するために、トランジションというプレカーサーイオンとフラグメントイオンの組み合わせを複数用いて定量を行う。総量が同じ4種のペプチドの測定により、総量の定量と、K16アセチル基特異的なペプチドの検出が出来た。さらに他の手法を用いることでK5アセチルを特異的に検出することも出来た。現在、4種全てを分別するために、K8, K12Acの判定法の検討を行っている。

その他にも、細胞周期の解析によりいくつかの知見が得られ、新規修飾候補部位も検出された。これらについて合成ペプチドを用い検証を行っている。さらに、細胞周期によって特異的に変動す

るいくつかのパターンについて詳細な解析を行っており、細胞周期を制御するエピジェネティックな制御の解明を目指している。

標的分子の活性測定系の樹立およびハイスループットスクリーニングについては、(2)「探索的実証研究」と密接に関連しているため事項で述べる。

## (2) 探索的実証研究

本プロジェクトで開発された基盤技術、および新規の創薬診断標的分子の有用性を実証することを目的に、研究開発項目②で実施する研究開発、及び予備的検討から選定された創薬標的分子に対して、活性ドメインのX線構造解析による構造決定と*in silico*スクリーニングを行い、研究開発項目③で新たに開発したアッセイ系も活用して、活性を阻害する化合物を探索する。

さらに、天然化合物ライブラリー等も活用して、後天的ゲノム修飾と複数種類の癌を関連づける複数の創薬・診断の標的候補分子に対し、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を、高感度かつ高精度な定量的アッセイ法を用いて複数個同定し、モデル生物等による検証も通じて標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾に着目した創薬基盤技術の有用性を実証する。そのため以下のとおり実施している。

活性測定にはMALDI-TOFMSを用いた。MALDI-TOFMSでは測定が簡便で迅速にペプチドの正確な質量情報が得られるため、メチル化の量やメチル基導入数が正確に分かる。また同時に、MS/MS解析を行えるので、メチル化されたアミノ酸部位の解析も行える。MALDI-TOFMSで活性が検出出来ない比較的活性が弱いものについては、高感度な活性検出のために放射性同位体 (RI) ラベル法を行った。その他にELISA法、高感度・ハイスループットスクリーニングを目指し、 $\alpha$ -スクリーニング法の構築も行った。標的分子に結合して活性を制御する分子を探索するために、*in silico*、MALDI-TOFMSによる*in vitro*スクリーニングを組み合わせ手法、天然物ライブラリースクリーニング、非天然ペプチドスクリーニングを展開している。

これまでに、当初計画のPR-SET7, G9a, EZH2, JMJD1Aの4標的について以下の結果が得られている。

### 1) PR-SET7

ヒストンH4K20モノメチル化酵素。白血病細胞株K562でsiRNAによりPR-SET7の発現抑制を行うと、巨核球への分化が促進されることが報告されている。また、前述したように、H4K20me1修飾は細胞周期G2期後期に上昇することが知られており、細胞周期での複製起点での役割が注目されている。PR-SET7は既に結晶構造が報告されていたため、大腸菌を用いてeXact-Tag精製システムにより精製タンパク質を調製し活性測定系の確立を行った。PR-SET7の活性中心であるSETドメインを用いて活性なタンパク質が得られ、MALDI-TOFMSでの活性測定を行った(図4)。

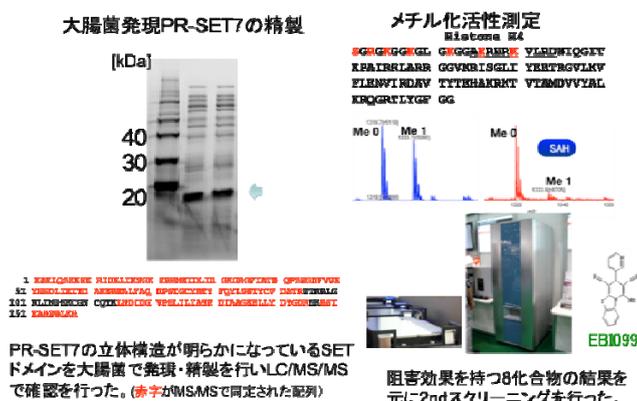


図4 PR-SET7のアッセイ法の構築

次に、標的タンパク質の構造情報を利用したStructure-based drug screeningと、既知活性化合物情報を利用したLigand-based drug screeningを組み合わせた*in silico*スクリーニングを行い、候補化合物を

選択した。

化合物データベースは、日本で購入可能なIDを有する分子量150以上の200万化合物カタログを使用し、Structure-based drug screening ではMultiple target screening (MTS) 法を、Ligand-based drug screening ではDocking score index (DSI) 法を用いた。

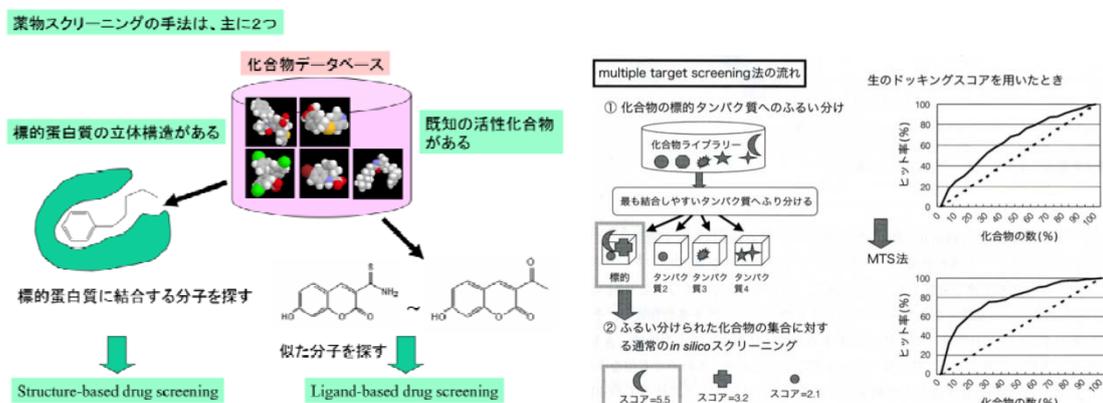


図5 *In silico*スクリーニングの概略(左)とMTS法の概念(右)

MTS法では、多数の化合物ライブラリーに対して、標的タンパク質以外に多数のタンパク質の構造を用意し、総当たり式にドッキング計算を行う。これらの多数のタンパク質に対して個々の化合物が結合する度合いを調べ、標的タンパク質に最も強く結合する化合物をヒット化合物候補とする。タンパク質数を増やすほどヒット率が向上するため、複数のエピゲノム修飾酵素を標的とした *in silico* スクリーニングによる特異性の向上が期待される。

標的タンパク質の構造についても、1酵素につき2~3種類の立体構造情報に対する分子動力学法に基づくモデリングを行い、各々6~7個の構造を準備して *in silico* スクリーニングを行い、その結果を統合する。その後、標的タンパク質の構造情報に基づいて化合物とのドッキング計算を行い、ドッキングの複合体構造を得る。これらの解析は、タンパク質-化合物ドッキングソフト myPresto sievgene による分子動力学計算により行った。

得られた結果から、薬剤として不適切な毒性が予測される、アルデヒド、ハロゲン化アルキル等を含む分子を除去し、合成展開にも適した分子量300以下の200化合物程度までに絞り込んだ。

標的に対して *in silico* スクリーニングにより選出された約200化合物を購入し、*in vitro* スクリーニングを行った。酵素の活性測定は、各ヒストン修飾に対応した合成ペプチドを用意し、ロボットによる自動化システムの構築も行った。活性測定は、質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて384プレートで行う。

上記いずれの場合でも、ヒストンメチル化酵素については、メチル供与体であるS-アデノシルメチオニン類似構造物であり、メチル化酵素共通の阻害剤となるS-アデノシルホモシステイン(SAH)をポジティブコントロールとして、それ以上の阻害活性を持つヒット化合物をスクリーニングする。

これにより約200化合物まで絞り込みを行い、複数のヒット化合物が得られた。この中で最も阻害活性が高かったEBI099は、白血病細胞株K562に細胞老化を誘導した。

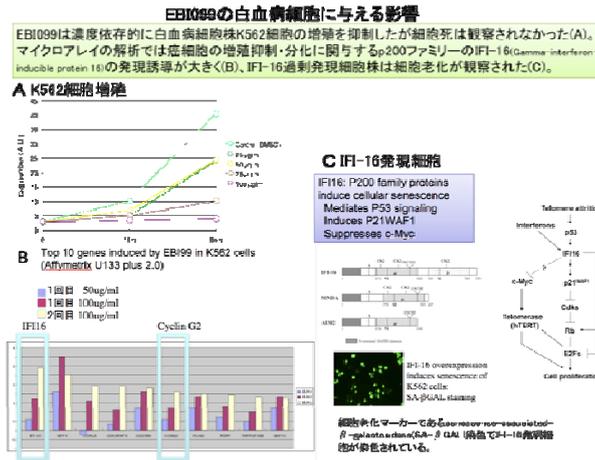


図 6 1<sup>st</sup> スクリーニングで得られた化合物の培養細胞での評価

しかしながら、EBI099 は高濃度でなければ細胞に効果がなかったため、より特異的な化合物を得るために、DSI 法を用いたドッキングシミュレーションによる類似化合物探索法も併用した 2<sup>nd</sup> *in silico* スクリーニングを行った。その結果、2<sup>nd</sup> スクリーニングではほとんどの化合物が 1<sup>st</sup> スクリーニングで使用した 100 μg/ml の濃度で阻害活性を示し、50 倍の阻害活性を持つ化合物が複数得られた。化合物と酵素蛋白の共結晶化を試み、1 化合物で結晶化に成功した。現在、その化合物について、検証実験として、候補化合物投与時の培養細胞株の H4 テールの修飾解析および細胞増殖に及ぼす効果を検討している。

## 2) G9a

ヒストン H3K9 メチル化酵素として知られる、癌の治療、iPS 細胞の誘導促進への可能性を持つ分子であり、既に構造解析も行われているので、PR-SET7 と同様に、活性を持つタンパクを発現・精製し、化合物の *in silico*・*in vitro* スクリーニングを実施し複数の化合物が得られた。G9a とヘテロダイマーを形成するヒストン H3 メチル化酵素 GLP を用いて G9a に対する特異性の解析を行うために、GLP 発現系の構築を行っている。現在、*in silico*・*in vitro* スクリーニングによって得られた候補化合物の評価を行い、2<sup>nd</sup> スクリーニングを行うかの検討を行っている。スクリーニングで得られた活性化合物について、癌の治療、iPS 細胞の誘導促進への可能性を検討する。

## 3) EZH2

EED、SUZ12、AEBP2、RbAp48 と PRC2 複合体を構成する Set ドメインを持つタンパク質であり、H3K27 メチル化活性を持ち、染色体のヘテロクロマチン化による遺伝子発現抑制作用を持つと考えられている。このような複合体を解析する系を立ち上げることは、他の複合体タンパク質にも応用可能である。

EZH2 は前立腺癌や乳癌、肺癌など様々な癌で発現が亢進し、またその発現量は、癌転移などの悪性度や患者の予後と良く相関することが報告されている。*In vitro* での EZH2 発現抑制により前立腺癌の増殖抑制や転移抑制効果が認められることから、EZH2 阻害剤は、これらの癌の有効な治療薬となり得る。

これまでに活性タンパク質の発現精製と *in vitro* アッセイ系の最適化、構造解析のための大量タンパク質の調製を行っており、昆虫細胞を用いた発現系で活性のある酵素複合体が得られている。*In vitro* スクリーニングに用いるさらに高活性なタンパク質複合体を取得するために、ヒト培養細胞

293F を用いた発現系も構築した。X 線構造解析を行うために、バキュロウイルスを用いて PRC2 複合体を構成する EZH2, EED, SUZ12 を Sf9 に発現させる系を作製し精製を行ったが、十分な量が得られなかった。しかし、この複合体を抗体作成に用いることで、EZH2, SUZ12, EED を免疫沈降可能なモノクローナル抗体が得られた。現在、プロテオミクスにより複合体解析を行い、新規または疾患特異的な構成成分を探索するための条件検討を行っている。

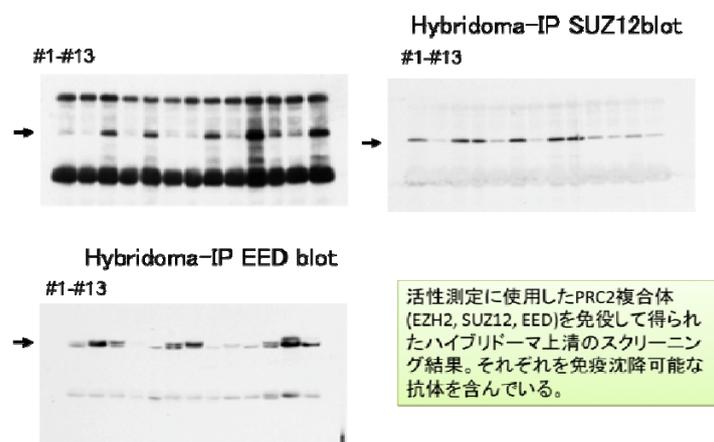


図 7 EZH2, SUZ12, EED 抗体のスクリーニング

結晶化のために、さらに大量発現させるカイコを用いた発現系を試み、カイコ 1 頭から 200  $\mu$ g の精製タンパクを得た。現在収量を上げるための条件検討中である。また、活性中心の X 線構造解析を行うため、大腸菌を用いて EZH2 の SET ドメインのみを発現させる系を構築した。

参加企業においても、293F 細胞を用いた発現系から精製したタンパクを用いて ELISA 検出系を構築し、市販の PRC2 より高い活性を持つことが確認できた。このタンパク質を用いて  $\alpha$ -スクリーニング法による阻害化合物のスクリーニングを行っている。

#### 4) JMJD1A

JmjC ドメインを有するヒストン脱メチル化酵素の一種である。JmjC ドメインは、Fe(II)イオン、および 2-オキソグルタル酸をコファクターとして、H3K9me2 および H3K9me 特異的に脱メチル化反応を触媒する。血管内皮細胞において、JMJD1A が低酸素下で HIF1A によって誘導される。固形腫瘍は増殖に伴って中心部が低酸素環境となることから、腫瘍栄養血管新生への JMJD1A の関与が推測される。そこで、H3K9 の脱メチル化介入により、病的条件下での遺伝子発現を網羅的に抑制する新規治療法となる可能性がある。

JMJD1A の全長発現タンパクを用いて、メチル化ヒストンペプチドの脱メチル化活性を検出した。現在、化合物スクリーニングを行うためのアッセイ系を構築中である。参画企業においても複数の手法でスクリーニング系を構築した。

#### 研究開発項目④「総合調査研究」

次世代シーケンサーは短鎖の配列情報を大量に産生できるが、リード長、所要時間の点でさらなる技術開発が必要である。2004年頃より NIH が 1000 ドルゲノム技術開発として投資してきた萌芽的技術がいよいよ実用化されつつある。半導体シーケンシング技術を採用したシーケンサーは蛍光色素を使用せず、デスクトップ型でありながら現時点で 1000 ドルゲノムの達成可能な技術として注目される。

一分子シーケンシング技術は生体内のエピゲノム標識を特定するために期待が大きい。2.5 世代といわれるヘリコス社の装置は微弱なエバネッセント光を検出する必要があり、20~30 塩基の読み取りが限界であり、現在は製造を行っていない。Zero mode waveguide 技術でリアルタイムに微弱な蛍光検出を可能にした Pacific Biosciences 社のシステムは数万塩基におよぶ長い配列解読を可能にし、修飾された DNA の検出も原理的に可能であるが、検体前処理方法の開発およびスループットの向上が今後の課題であると思われる。

ナノポア技術を応用した一分子シーケンシングは、低コスト、短時間を実現しうる技術として期待されている。今年度後半には、Oxford Nanopore Technology 社よりチャンネル分子を利用した装置の販売が予定されている。

国際エピゲノムコンソーシウム (International Human Epigenome Consortium) は米国および EU を中心に形成され、我が国も昨年度末より参画し、プロジェクトが稼働している。

構造ゲノミクスコンソーシウム (Structural Genomics Consortium) はトロントを拠点として、製薬企業等からの支援を受けながらエピゲノム関連タンパク質の構造解析を系統的に実施している。

プロテオミクスに用いられる質量分析計は、用途により、ハイスループットなMALDI-TOFMS、探索研究・絶対定量に用いられるLC-MSに大きく分けられる。

ハイスループット用のMALDI-TOFMSはLC-MSに比べ進化の度合いが遅いが、この5年ほどで主要メーカーはデータ取得速度を上げ、現在プロジェクトで用いているMSの20~40倍のスピードでデータを取得できるようになっている。その他の動作の高速化、高感度化とあわせ100倍以上高速である。さらにソフトウェアの改良が見られ、熟練の技術が無くとも操作出来るようになっている。エピゲノム研究においてはこれら高速のMALDI-TOFMS が*in vitro*での活性検出などで使用されているが、近々に大幅な改良は見られないと思われる。

探索的研究に用いられるハイブリッド型LC-MSは、高速・高感度・高分解能化の競争が激しく、数年前までは1秒間に高分解能MS、高分解能MS/MSを1回、または低分解能MS/MSを3回程度だったが、現在では高分解能MS/MSを1秒間に10回出来るものが出ており、一測定で1,000タンパク質以上を同定できるものが一般的になりつつある。昨年導入したOrbitrap ELITE ETDは最新機種であり、高分解能MS/MSは1秒間に4回程度であるが、超高分解能MSを行うことが出来、他の機種では分離できないトリメチルおよびアセチル化ペプチド混合物をMSだけで完全に分離識別することが出来る。今後さらに高分解能MS/MS の高速化が望まれ、業界的にもさらに高分解能・高速化が進展すると考えられる。

ヒストン修飾組み合わせ手法の開発は、米バージニア大学Donald F Huntが開発した質量分析計 (MS) での新規ペプチド開裂手法であるETD (electron transfer dissociation : 電子転移解離) を用い、Huntラボ出身のプリンストン大学のBenjamin A Garcia、米ウィスコンシン大学のJoshua J. Coonらの少数のグループにより行われている。最近Garciaのグループからの報告が多い。ここで使われているOrbitrapの最新機種であるELITE ETD は、ヒストンのトップダウン解析を行っているNile

kelleher ラボや網羅的プロテオミクスを行っているMatthias Mann ラボにも導入されているという情報がある。ETDはヒストン解析など特殊な用途に使用されているのみで、国内では医薬基盤研と東大先端研以外ではほとんど使用していないと思われ、MS本体の高性能化とは異なり、今後の高性能化は未知である。

ここ数年で最も進歩が早いのは Triple-Q MS である。プロテオミクスに使われ始めたのは最近であり、選択反応モニタリング (selected reaction monitoring : SRM) または多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring : MRM) という手法で標的タンパク質の高感度絶対定量に用いられる。世界では数グループがヒト全タンパク質の定量を目指した大規模な研究を行っており、シアトルのシステムバイオロジー研究所 (ISB)、スイス連邦工科大学では SRM atlas として定量に必要な情報を公開しており ([www.srmatlas.org](http://www.srmatlas.org))、これには MS メーカーも参画している。国内では九州大と産総研のチームが全タンパク定量のための標準タンパク質を作成してヒトプロテオーム定量システムの構築を行っている。Triple-Q MS はここ数年でのイオンの取り込み、光学系の改良による高感度化、高速化が著しく、1 測定で 100 以上のタンパク質の定量が可能になっている。主に疾患特異的タンパク質の定量を目的に行われているが、そのためには健常人から患者までの幅広いダイナミックレンジで定量可能なことが必要である。今後さらなる高速・高感度化、広ダイナミックレンジ、高選択性が見込まれる分野である。

現在われわれは特定のヒストン修飾組み合わせを SRM で定量する系を構築中であるが、世界的に見ても、タンパク質の定量ではなく翻訳後修飾を SRM で定量した報告はほとんど無い。技術が確立すれば今後注目を浴びると考えられる。

## IV. 実用化の見通しについて

### 1. 実用化の見通し

DNA メチル化異常は前癌病変を含む発癌プロセス早期において既に確立されることが多く、癌のスクリーニングのマーカースとして好適である。測定対象は、脱落した癌細胞から血液中に放出された流血中のゲノム DNA であり、早期診断への活用が期待される。多くの癌腫でメチル化異常を示す領域がある一方で、癌種によって選択的にメチル化される遺伝子があることから、一次スクリーニングおよび臓器別のスクリーニングにも有効である可能性が期待される。既に多数の癌選択的な DNA メチル化マーカースを抽出し、一部は特許出願も終えている。臨床血液検体を用いた検証、既存のメチル化マーカースとの性能比較も開始している。

メチル化関連酵素は、分子ファミリー自体が比較的近年同定されたことに加えて多様であることから、優先的に阻害剤開発を進めるべく、アッセイ系を構築し、参加企業での独自化合物ライブラリースクリーニングへの展開を予定している。立体構造が決定されている分子については、*in silico*での化合物デザインから結合化合物をスクリーニングして加速化をはかる一方、独自に立体構造決定を進め、標的分子からリード化合物同定までのプロセス短縮を目指している。

## 添付資料

- 健康安心イノベーションプログラム基本計画
- プロジェクト基本計画
- 平成 24 年度実施方針
- 事前評価関連資料
- 特許・論文・学会発表リスト

## 健康安心イノベーションプログラム基本計画

# 健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日

産業技術環境局

製造産業局

## 1. 目的

今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上を図ることが求められている。

この目的を達成するため、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の提供を実現するほか、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図る。

## 2. 政策的位置付け

### ○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

強みを活かす成長分野として「グリーン・イノベーション」分野と「ライフ・イノベーション」分野を策定、人材育成や技術開発を後押しするほか、需要を創造すると同時に利用者の立場に立った社会ルールの変更に取り組む。また、政府は新たな分野に挑戦する人々を支援するとしている。

### ○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間において革新的な医薬品・医療機器の創出に向け、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価、官民対話等、研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援を実施することとしている。

### ○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス活用等の課題に対処すべく、イノベーション強化11項目や官民が協働で取り組むべき最重点課題を策定した。

### ○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業

構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

○「iPS細胞研究の推進について（第一次とりまとめ）」（2008年7月3日総合科学技術会議 iPS細胞研究WG）

iPS細胞研究の成果がもたらす医療への波及効果や新しいバイオインダストリーの進展等について検討を行い、iPS細胞研究を推進するための研究推進体制、国の支援の在り方、知的財産戦略、国際化協力の在り方等を取りまとめた。

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

生涯健康な社会形成に向けて中長期的に取り組むべき課題として、治療重点の医療から予防・健康増進を重視する保健医療体系の転換、生命倫理・安全性と医療技術促進政策の調和などをとりあげ、再生医療及び在宅医療・介護に係る社会還元加速プロジェクトを実施するとともに、臨床研究・臨床への橋渡し研究をはじめとする研究開発ロードマップの提示により所要の措置を講じていくこととしている。

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

がん対策基本法に基づき、国、地方公共団体及び関係者等が、がん対策を総合的かつ計画的に推進するために策定された基本方針であり、取り組むべき施策の一つとして「がん研究」が取り上げられている。具体的には、現状、診断薬・診断機器の開発、治療薬・治療機器の開発等が推進されているが、さらに、有用な早期診断技術についての研究開発の推進等に取り組むことが提示されている。

○新健康フロンティア戦略（2007年4月新健康フロンティア戦略賢人会議）、同アクションプラン（2007年12月）

健康寿命の延伸や生活の質の向上を図ることを目的として策定された新健康フロンティア戦略及び新健康フロンティア戦略アクションプランの中で、「人間の活動領域の拡張に向けた取組」及び「医療・福祉技術のイノベーション」において、「先進的予防・診断・治療技術の開発」や「医薬等ベンチャー・基盤産業支援対策」等の施策が提示されている。

### 3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。

- ③医療機器<sup>1</sup>など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

#### 4. 研究開発内容

##### I. 創薬・診断

###### I-1. 革新的医薬品の創出

###### (1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

###### ①概要

我が国が強みを持つ糖鎖工学分野において、これまでに取得・開発した「糖鎖遺伝子ライブラリー」「糖鎖構造解析技術」「糖鎖合成技術」を活用し、癌や感染症など様々な疾病に関与する糖鎖の機能を解析する基盤技術を確立し、我が国の優位性を維持するとともに、創薬・診断等の分野における糖鎖機能の産業利用の促進を図る。

###### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、糖鎖や糖タンパク質などの機能を分子レベルで効率的に解明するための基盤技術、糖鎖の機能解析・検証技術、及び、有用性が認められた糖鎖機能を産業利用するための基盤技術を開発する。

###### ③研究開発期間

2006年度～2010年度

###### (2) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）（運営費交付金）

###### ①概要

我が国が強みとする完全長cDNAライブラリーやタンパク質相互作用解析技術等を最大限に活用し、重要なタンパク質ネットワーク解析等により創薬の対象となるタンパク質の効率的な絞り込みを行うとともに、疾患等の生物現象を制御する化合物の探索まで、一貫した技術開発を行う。

###### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術や疾患を制御する化合物の探索・評価技術を開発する。

###### ③研究開発期間

2006年度～2010年度

<sup>1</sup> 医療機器は、画像診断システムなどの「診断機器」、内視鏡下手術支援システムなどの「治療機器」、その他家庭用医療機器、歯科材料、眼科用品を含む。

### (3) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）

#### ①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情報を取得することは創薬研究において重要であるが、その解析は非常に困難である。そこで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

#### ②技術目標及び達成時期

2011年度までに生体内に近い状態での膜タンパク質及びその複合体の構造解析手法、リガンド分子との相互作用解析手法を確立するとともに、当該技術から得られた情報に基づく in silico スクリーニング手法を確立する。

#### ③研究開発期間

2007年度～2011年度

### (4) 新機能抗体創製技術開発（運営費交付金）

#### ①概要

ポストゲノム研究や診断・創薬等において重要となっている機能を有する抗体を創製するため、創薬標的として産業利用上重要だが、解析が困難な膜タンパク質やタンパク質複合体を特異的に認識できる抗体を系統的に作成する技術や抗体の分離・精製を高効率に行うための技術の開発を行う。

#### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、産業上有用と考えられるタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を創製するための基盤技術、及び、製造コスト低減に向けた抗体の分離・精製等を高効率に行う技術を開発する。

#### ③研究開発期間

2006年度～2010年度

### (5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）

#### ①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企

業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となって行う、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

2011年度までに医療現場及び臨床研究からのフィードバックに基づく研究開発により、医薬品、医療機器、診断ツール等の研究開発成果を円滑に実用化につなげる仕組みを確立する。

③研究開発期間

2007年度～2012年度

（6）幹細胞産業応用促進基盤技術開発（運営費交付金）

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待されるiPS細胞等幹細胞について、産業応用に不可欠な基盤技術の開発や、iPS細胞に関連した産業応用事例創出の促進を行う。

②技術目標及び達成時期

2013年度までに、安全で効率的なiPS細胞の作製技術を開発するとともに、産業応用に繋げるために必要となるiPS等幹細胞の選別・評価・製造技術を開発し、産業上利用可能な創薬スクリーニングシステムを確立する。

③研究開発期間

2009年度～2013年度

（7）後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

がんや生活習慣病などの後天的疾患の原因として重要な因子である「後天的な遺伝子の変化（後天的ゲノム修飾）」を解析する技術や疾患との関連づけにより診断の指標を特定する手法の開発等を実施する。

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応した解析技術の高精度・高感度化、システム化を行うとともに、開発した技術やモデル動物等を活用し、後天的ゲノム修飾と疾患との関連づけを行う。また、探索的実証研究として、制御因子の探索・同定、制御に関する検証を行う。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

（1）個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

我が国が有する微細加工技術・表面処理技術といったナノテク等の強みを活かし、染色体異常を高感度、高精度かつ迅速、安価で非コード領域までを検出するゲノムアレイや解析基盤技術開発を行うとともに、診断への応用を可能とする全自動解析システムの開発を行う。

#### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、BACを用いた非コード領域を含むゲノム全領域を検出できる高精度ゲノムアレイを開発する。さらに、臨床現場において、微量サンプル（数ナノグラム）から、12時間以内に染色体異常（増幅、欠失、コピー数多型等）を、低コストかつ定量性・再現性を確保して検出ができる自動染色体異常解析システムのプロトタイプを開発する。

#### ③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

### I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

#### (1) 統合データベースプロジェクト

##### ①概要

ライフサイエンス分野では、自身の研究成果と既存の研究成果と対比することにより、自身の研究成果の仮説を考案する手がかりが得られたり、新しい実用化の発想が得られたりする可能性があるため、国家プロジェクト等により産生された研究データを一括して活用できるデータベースが、産業界や社会から要望されている。

このため、政府全体の“生命科学データベース統合化の取組”の一環として、経済産業省関連の公的資金研究から産出される研究データを、産業上の有用性を評価のうえ、統合化し、産業界等に提供する。

##### ②技術目標及び達成時期

2010年までに経済産業省関連機関により実施されたライフサイエンス分野の研究開発プロジェクトの成果に関する情報提供サイトを構築・運用する。また、ヒト遺伝子に関連した各種研究成果に関しては、平性17～19年度に実施したゲノム情報統合プロジェクトにおいて構築した「ヒト全遺伝子のアノテーション統合データベース (H-Invitational)」を基礎として、経済産業省関連の研究成果を連携して利用できるシステムを構築する。

##### ③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

## II. 再生医療

## II-1. 再生医療の実用化

(1) 次世代機能代替技術研究開発事業（うち、次世代再生医療技術研究開発）（運営費交付金）

### ①概要

生体内で自己組織の再生を促すセルフリー型再生デバイスや、少量の細胞により生体内で自律的に成熟する自律成熟型再生デバイスの実用化を促進するとともに、これら再生デバイスにおける有効性・安全性の評価技術等を確立する。

### ②技術目標及び達成時期

2014年度までに、生体内で自己組織の再生を促進するための細胞外マトリクス、幹細胞誘導・分化促進因子等の再生医療技術を確立し、工学的技術との組み合わせにより、セルフリー型再生デバイス及び自律成熟型再生デバイスを作製する。また、それらを用いて再生した組織等の有効性・安全性に関して、低侵襲で高精度な評価技術の標準化に取り組む。さらに、開発する再生デバイスを低侵襲に植込む技術を確立する。

### ③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

## II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

### ①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

### ③研究開発期間

2008年度～2010年度

### Ⅲ. 医療機器

#### Ⅲ－１. 医療機器の開発

がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

##### 概要

がんの診断・治療の革新を一体の課題として捉え、多様な治療法選択が可能となり早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

##### 技術目標及び到達時期

診断機器システムとしては、分子プローブ等の薬剤並びにそれらの薬剤を用いる高感度・高解像度な画像診断システム、病理診断の効率・信頼性を向上させる病理画像等診断支援システム、遺伝子診断の信頼性を向上させる検体前処理技術を備えた血中がん分子・遺伝子診断システム等を開発する。

治療機器システムとしては、より侵襲性の低い外科的治療を実現する内視鏡下手術支援システム並びに高精度で容易なオペレーションを可能とするX線治療機器を開発する。

##### 研究開発期間

2010年度～2014年度

（うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度）

（２）基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

（３）次世代機能代替技術研究開発事業（うち次世代心機能代替治療技術研究開発）（運営交付金）

##### ①概要

小柄な体格にも適用可能な小型の製品で、血栓形成や感染を防ぎ、長期在宅使用が可能な植込み型補助人工心臓を開発する。

##### ②技術目標及び達成時期

2014年度までに、小児を含めた小柄な患者への適用を可能とする、長期使用可能な小型の植込み型補助人工心臓を作製するとともに、有効性及び機械的・電氣的・生物学的な安全性の評価を行う。

##### ③研究開発期間

2010年度～2014年度

#### Ⅲ－２. 医療機器の開発に係る基盤整備

（１）医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

### ①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て、個別の医療機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

### ②技術目標及び達成時期

2010年度までに、今後実用化が期待される先進的な医療機器について、工学的安定性や生物学的安定性等に関する詳細な評価基準を策定し、開発ガイドラインとして取りまとめる。また、平成21年度事業において検討・整理された医療機器産業への参入を促す方策や部材供給の活性化方策の具体化を図るため、様々なマッチング機会をコーディネートする人材育成や事業者の海外展開支援策並びに部材供給取引契約にかかるガイドラインの作成及びPL保険のあり方や普及方法等についてさらに検討を加え、医療機器産業の活性化に資するものとする。

### ③研究開発期間

2008年度～2010年度

## IV. 福祉機器

### IV-1. 福祉機器の開発

#### (1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

##### ①概要

「福祉用具の研究開発及び普及の促進に関する法律」（福祉用具法）に基づき、高齢者・障害者及び介護者の生活の質の向上を目的として、生活支援分野、社会活動支援分野を中心とした福祉用具の実用化開発を行う民間企業等に対し、研究開発費用の2/3以内を補助することで、多様な福祉ニーズに対応するとともに、当該分野における新産業の創出、成長の促進に資する。

##### ②技術目標及び達成時期

高齢者、障害者の生活支援、社会参加支援に資する福祉用具の実用化開発を促進することにより、高齢者等の生活における負担の軽減を図り、安全で安心のできる生活を実現する。より具体的な目標として、各々の補助対象事業終了後3年経過した時点で50パーセント以上を製品化する。

##### ③研究開発期間

1993年度～

### IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

#### (1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

### ①概要

福祉用具法に基づき、民間による福祉機器の実用化のための研究開発を促進するため、福祉機器に関する産業技術に係る情報の収集・分析・提供事業を実施することで、当該分野における福祉機器の普及や新規産業の創出・成長の促進を図る。

### ②技術目標及び達成時期

各年において福祉機器に係るニーズ等の調査の実施及び福祉用具実用化推進事業で開発された福祉機器の各種展示会等への出展による情報収集・分析・情報の提供を実施する。

### ③研究開発期間

1993年度～

## 5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

### [標準化]

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインターネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。
- ・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

### [導入普及促進]

- ・ゲノム研究の進展は、個人遺伝情報を用い、情報技術を駆使した幅広い医療・健康サービスによる人々の健康や福祉の向上、さらには新しい医療・健康サービス産業の育成に重要な役割を果たそうとしているが、その際、人権を尊重し、社会の理解と協力を得て、個人遺伝情報の厳格な管理の下で適正に事業を実施することが不可欠である。そのため、個人遺伝情報を安全に保護するために作成した事業者が遵守すべきルール「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン（2004年12月17日告示）」（個人遺伝情報保護ガイドラインという）を適切に運用する。

### [産業間連携]

- ・バイオベンチャーは商品を市場に送り出すまでに長期間を要する、研究開発のために多額の資金調達を必要とする、事業を行うために様々な規制・審査を経る必要がある等、他業種のベンチャー企業と比較して困難な問題を抱えていることが多い。そのため、バイオベンチャーの様々な問題に対して施策への反映を検討し、補助金等の施策の紹介を通じてバイオベンチャー振興を図る。

・「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等を実施していく。

・医療の進歩・国民の健康に貢献する医療機器・用具の産業技術力向上及び国際競争力強化を目指し、研究開発から市場化までのすべてのプロセスにおけるマクロな戦略の検討と、医療機器の重要性について社会的認知の向上を実現するための仕組み及び個別プロジェクトの形成をはかることを使命とした「医療技術産業戦略コンソーシアム（METIS）」が平成13年に設立され、平成21年10月より第4期に入っている。。

#### [プロジェクト等間の連携について]

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発）については、タンパク質機能解析・活用プロジェクトの成果を活用することで、超高速・高感度にタンパク質の相互作用を解析する技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

・糖鎖機能活用技術開発については、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリー構築、糖鎖エンジニアリングプロジェクトの成果を活用することで、糖鎖の機能を効率的に解析するための基盤技術を開発する。

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発の「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」、「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」については、必要に応じ、各々の成果を活用し、効率的、効果的な研究開発を図る。

#### [関係機関との連携]

・総合科学技術会議が推進する基本政策推進専門調査会 分野別推進総合PT ライフサイエンスPT及び科学技術連携施策（「生命科学の基礎・基盤」、「臨床研究・臨床への橋渡し研究」）の下、各プロジェクトについて、関係府省との適切な連携を図る。

#### [その他]

・一段と激化する特許戦争の中、成果実用化・効率的な研究開発を推進するため、プロジェクト企画段階から、研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施やプロジェクト実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組（プロパテントアプローチの導入）を実施する。

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政

法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

・福祉機器においても、中小企業等産業側の観点を福祉政策に活かすため2008年より独立行政法人産業技術総合研究所の職員を厚生労働省に派遣中である。

## 6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

事業の全部又は一部について独立行政法人の運営費交付金により実施されるもの（事業名に（運営費交付金）と記載したもの）は、中期目標、中期計画等に基づき、運営費交付金の総額の範囲内で、当該独立行政法人の裁量によって実施されるものである。

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

## 7. 改訂履歴

平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。

平成14年2月26日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。

平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム（平成12・12・27工総第13号）は、廃止。

平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成14・02・25産局第4号）は、廃止。

平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成14・02・05産局第2号）は、廃止。

平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画（平成15・01・23産局第4号）及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画（平成15・03・07産局第17号）は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。

平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成16・02・03産局第12号）は、廃止。

平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成17・03・25産局第1号）は、廃止。

（9）平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成18・03・31産局第2号）は、廃止。

（10）平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成19・03・20産局第5号）は、廃止。

(11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成20・03・25産局第6号）は廃止。

(12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画（平成21・03・26産局第3号）は廃止。

## プロジェクト基本計画

(健康安心イノベーションプログラム)  
「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」

基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

①政策的な重要性

本研究開発は、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

現在の医薬品開発においては、副作用が少なく効果的な薬の開発のため、ゲノム情報を活用した創薬研究が主流となってきている。創薬における研究開発費が1物質当たり500億円を超え増加の一途をたどる一方で、新薬上市件数は低下するという世界的傾向の中、創薬研究の効率を上げ、研究開発リスクを低減させることが喫緊の課題となっている。医薬産業政策研究所「製薬産業の将来像」によれば、創薬プロセスにおけるボトルネックの一つとして、標的分子候補と疾病の関係を推定し新薬の目標を確定する「ターゲットバリデーション」が挙げられており、画期的な新薬を生み出すためには、基礎研究の進展に伴う新しい知見を取り込み、新規メカニズムに基づく創薬標的分子を同定していくことが重要である。

②我が国の状況

近年のギガシーケンサー及び高精度質量分析装置等の解析技術の急速な進展により、後天的ゲノム修飾が疾患等の原因として重要な因子であることが相次いで明らかになり、研究者の注目を集めている。後天的ゲノム修飾は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。技術戦略マップ2009（平成21年4月経済産業省策定）においても、後天的ゲノム修飾の解析は、波及効果が高く、「画期的な医薬品の開発」、「医薬品開発の効率化」に資する重要技術として位置づけられている。

しかし、後天的ゲノム修飾の解析等の技術開発は世界最先端の分野であり、後天的ゲノム情報と疾患との関連は未だに一部を除いては解明されておらず、解明に必要となる臨床情報の付随した検体の入手も困難である。また研究を開始するためには、高精度な解析技術や情報処理技術等、後天的ゲノム解析のための先進的技術導入や専門の人材の育成等に莫大な時間と投資が必要であり、民間企業等が独自に研究を進めるのはリスクが高い。

### ③世界の取り組み状況

米国では、NIH（国立衛生研究所）のロードマップの一つに位置づけ、2008年より5年間で総額1億9000万ドルを超えるプロジェクトを開始している。我が国においても、企業・研究者・臨床家の連携の下に一体的なオープンイノベーションを可能とする世界トップレベルの産学連携体制を構築し、最適な技術・情報基盤を確立するためには、国の支援が不可欠である。

### ④本事業のねらい

本事業では、疾患の原因となる後天的ゲノム修飾の効果的・効率的解析手法の開発を行い、後天的ゲノム修飾を高感度で検出するシステムを構築するとともに、複数種類の癌との関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発する。さらに、後天的ゲノム修飾に起因する複数種類の癌に対し、後天的ゲノム修飾を制御する分子等を用いた探索的実証研究を通じて、基盤技術としての有用性を検証する。

これにより、プロジェクト期間中に最先端の技術を、学から民へと移転をするとともに、創薬ターゲットとなりうる後天的ゲノム修飾が解析されれば、企業による医薬品開発が加速され、20数年後には、1製品あたり1000億を超えるブロックバスターと呼ばれる医薬品の導出も期待される。さらに将来、個人の後天的ゲノム情報に基づいて疾患の個体差や進行度に応じた標的治療薬による質と費用対効果の高い治療が実現されれば、国民の健康の維持・増進や創薬産業等のイノベーション、医療財政の負担軽減、我が国の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。

## (2) 研究開発の目標

### ①過去の取り組みとその評価

NEDOでは、平成19年度に「エピジェネティクスに関する研究動向及び産業応用への課題に関する調査」を実施した。20名を超える国内のエピジェネティクス関連の専門家、有識者の講演および調査結果をまとめ、以下の課題に対する国家的支援が必要との結論を得た。

- 1) 個別がんでのエピジェネティック異常を解明することに基づいて、がんのリスク、存在、性質の診断技術を開発し、がんを対象としたエピジェネティクス創薬に向けたターゲット探索に取り組む。
- 2) がん以外の後天性疾患（免疫系疾患、神経系疾患、糖尿病等の生活習慣病）へのエピジェネティック異常の関与の有無を解明する。
- 3) クローン、iPS細胞、ES細胞、再生臓器等における細胞の評価・タイピング・プロファイリングにエピジェネティクスを応用する研究開発を推進する。
- 4) エピジェネティクス分野での研究を進める上での技術・ツールの開発を促進し、診断目的の高感度・高精度検出装置の開発に取り組む。

### ②本事業の目標

#### 【最終目標（平成26年度末）】

後天的ゲノム修飾を現状の100倍程度の高感度高精度で解析する技術、および解析データの標準的情報処理技術を確立する。

これらの解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける創薬・診断標的候補分子を選定する。

候補分子を制御する因子を用いて創薬・診断標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。

#### 【中間目標（平成 24 年度末）】

後天的ゲノム修飾を現状の 10 倍程度の高感度高精度で解析する技術、および解析データの情報処理技術を開発する。

これらの解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける候補分子を探索する。

候補分子を制御する因子を用いてその妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を確認する。

#### ③本事業以外に必要とされる取り組み

研究対象として不可欠なヒト臨床サンプルを効率的に収集し、取り扱うための仕組み作りや規定の整備が必要である。

また、後天的ゲノム修飾は各個人で異なることから、将来的には後天的ゲノム情報を個人情報として取り扱う必要がある。個別化医療の実現に向けた個人情報取り扱い規定の整備等が必要である。

#### ④全体としてのアウトカム目標

後天的ゲノム修飾を指標とする個別化診断・医薬品開発の技術基盤として広く普及することにより、予防的な診断・治療体系を構築する。

### (3) 研究開発内容

上記目標を達成するために、以下の研究開発項目について、別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、産学官の複数事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する事業であり、委託事業として実施する。

- ① 後天的ゲノム修飾解析技術開発
- ② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発
- ③ 探索的実証研究

## 2. 研究開発の実施方式

### (1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO」という）が、単独ないし複数の、原則、本邦の企業、大学等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点から国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

共同研究に参加する各研究開発グループの有する研究ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体には、NEDO が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究開発項目毎にサブ・プロジェクトリーダーを置くとともに、研究者を結集し、集中研究方式にて効率的な研究開発を実施する。

## (2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有する NEDO は、経済産業省及び研究開発実施者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて設置される技術検討会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度、プロジェクトリーダー等を通じたプロジェクトの進捗に関する報告、年 2 回開催する運営委員会、自己評価報告書等を通じて進捗状況を管理するとともに、必要に応じて事業の見直しを行う。

## 3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成 22 年度から平成 26 年度までの 5 年間とする。

## 4. 評価に関する事項

NEDO は、技術的および政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成 24 年度、事後評価を平成 27 年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ、必要に応じ、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

## 5. その他重要事項

### (1) 研究成果の取り扱い

#### ① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、創薬診断分野への活用に向け、NEDO、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 後天的ゲノム修飾の高感度解析技術
- b) 後天的ゲノム修飾情報解析技術
- c) 後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける情報基盤
- d) 後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける創薬・診断標的分子情報
- e) 後天的ゲノム修飾の定量的解析技術
- f) 探索的実証研究により妥当性が検証された後天的ゲノム修飾制御因子情報

#### ② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備事業又は標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準案の提案等を積極的に行う。

### ③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第 25 条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

### ④成果の産業化

- a) 受託者は、本研究開発から得られる研究開発成果の産業面での着実な活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取り組みのあり方や、研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを念頭に置き研究開発を行うとともに、研究開発の進捗等を考慮し、これらの取り組みのあり方とビジネスモデルについて、必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記 a) で立案した取り組みとビジネスモデルを、本研究開発終了後実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

## (2) 基本計画の変更

NEDO は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

## (3) 根拠法

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第 15 条第 1 項第 2 号に基づき実施する。

## (4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 16 年 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「産業経済分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成 16 年 12 月 17 日 経済産業省）等を厳守する。

## 6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成 22 年 3 月、制定。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

### 1. 研究開発の必要性

後天的ゲノム制御に関わる DNA メチル化、ヒストン修飾等を解析する基本技術はすでに開発されているが、現在の技術の感度や精度、解析標的に対する特異性、有意な情報のみを取得する選択性等にはまだ課題が多い。特に現状では、ヒストン修飾等後天的ゲノム修飾を解析するための有用な解析用抗体は数少ない。また、解析対象となるサンプルを大量に収集する必要があり、かつサンプル中の不要な部分を除去する技術も不十分であるため、解析精度の向上が必須である。

これらの課題を解決するため、後天的ゲノム解析の高感度かつ網羅的な解析技術を開発する必要がある。また、多数の後天的ゲノム修飾因子の系統的なマッピングや網羅的解析を実現するためには、最新の高精度高感度解析手法や機器を組み合わせた、新たな解析基盤技術の開発とともに、後天的ゲノム修飾の解析により得られる膨大な情報に対し、IT 技術等を活用した新たな標準的情報解析基盤技術の開発が必須である。

### 2. 研究開発の具体的内容

#### (1) 後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

ヒストン修飾解析等に必要となる多種類の解析用抗体からなる抗体パネルを作成し、後天的疾患に由来する複数種類の癌のヒト臨床サンプルおよび代表的なヒト正常細胞を対象として、多種類のヒストン修飾や修飾因子を系統的にマッピングする技術を開発する。また、質量分析法等を用いて、後天的ヒストン修飾の組み合わせコード（アセチル化、リン酸化、メチル化修飾の組み合わせを判定）を測定するための解析基盤技術を構築するとともに、解析に必要な検体の微量化を実現する高感度解析技術を開発する。

#### (2) 後天的ゲノム修飾解析技術の情報解析基盤技術の開発

後天的疾患を有する臓器等の後天的ゲノム修飾を解析して得られる膨大な情報と既存の生命情報データを統合し、取得データから必要な情報を効率的に抽出し可視化する、IT 技術等を活用した新たな標準的情報処理技術を開発する。

### 3. 達成目標

#### 【最終目標（平成 26 年度末）】

後天的ゲノム修飾の組み合わせコードを測定し系統的にマッピングするため、新たなヒストン修飾解析用抗体、ヒストン修飾酵素用抗体からなる抗体パネルを作成するとともに、質量分析法等を活用して、現在の 100 倍程度の高感度解析技術を開発し、微量検体での解析法を確立する。また、後天的ゲノム修飾解析データから有用な情報を効率的に選抜する、新たな標準的情報処理技術を確立する。

#### 【中間目標（平成 24 年度末）】

後天的ゲノム修飾の組み合わせを解析するため、新たなヒストン修飾解析用抗体、ヒストン修飾酵素用抗体を作成するとともに、質量分析法等を用いて、現在の 10 倍程度高感度で解析できる技術を開発する。また、後天的ゲノム修飾解析データから有用な情報を効率よく選抜し、可視化するための手法を開発する。

## 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

### 1. 研究開発の必要性

後天的ゲノム修飾は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣病等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の探索や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。新規医薬品開発はメカニズムベース（分子標的創薬）に変化し、標的の同定が創薬の成否を握るため、ヒストンメチル化、脱メチル化をはじめとする後天的修飾情報を制御する数百に及ぶ修飾因子群は、有望な創薬標的となりうる。また、後天的ゲノム修飾を原因とする疾患を予防あるいは発見するためには、後天的ゲノム修飾を標的とした新たな診断法の開発も必要である。しかし、後天的ゲノム修飾の解析等の技術開発は世界最先端の分野であり、後天的ゲノム情報と疾患との関連は未だに一部を除いては解明されていない。

これらの課題を解決するため、解析対象となる複数種類の癌のヒト臨床サンプルを効率的に収集し、研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術も活用して、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因分子等を探索することにより、後天的ゲノム修飾異常と疾患とを関連づけ、新たな創薬・診断の標的候補分子を同定する必要がある。

### 2. 研究開発の具体的内容

#### (1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

どのような後天的ゲノム修飾の変化によってどのような後天的疾患が発生するか、疾患と後天的ゲノム修飾の関連づけを行う。解析対象となる複数種類の癌のヒト臨床サンプルを効率的に収集し、研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術も活用して、後天的ゲノム修飾の組み合わせの解析等により得られる情報基盤を用いて疾患と正常の比較分析を行うことにより、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を探索するとともに、新たな創薬・診断の標的候補分子を同定する。

### 3. 達成目標

#### 【最終目標（平成 26 年度末）】

後天的ゲノム修飾と複数種類の癌とを関連づける後天的ゲノム修飾異常を同定するため、5 種類程度の癌について解析を行い、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を同定するとともに、15 個程度の創薬・診断標的候補分子を選定する。

#### 【中間目標（平成 24 年度末）】

後天的ゲノム修飾と複数種類の癌とを関連づけるため、3 種類程度の癌について解析を行い、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を探索するとともに、5 個程度の創薬・診断標的候補分子を探索する。

### 研究開発項目③「探索的実証研究」

#### 1. 研究開発の必要性

後天的ゲノムを標的とする医薬品は、抗癌剤領域において、従来難治性だった骨髄異形成症候群に対する DNA メチル化酵素阻害薬 (Decitabine)、皮膚の T 細胞性リンパ腫に対するヒストン脱アセチル化 (HDAC) 酵素 (Vorinostat) 等が知られるが、近年解明された各種の後天的ゲノム修飾を標的とした薬剤は存在しない。既存の医薬品は一部の癌に有効であるものの特異性が低く、それに代わる特異性の高いヒストンメチル化および脱メチル化酵素阻害剤の開発が必要である。癌のみならず、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣病等の後天的疾患と関連する後天的ゲノム修飾を標的とする医薬品や診断法を効率的に開発するためには、多数の試験サンプルに適応可能な、後天的ゲノム修飾の高感度かつ高精度な定量的測定法の開発が必須である。

この課題を解決するため、研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術をベースとして高感度なハイスループットアッセイ法を構築し、新たに発見された後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける標的候補分子に対して、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を複数個程度選定し、創薬・診断の指標としての妥当性を検証する必要がある。本事業で開発された後天的ゲノム修飾解析基盤技術が有用であることが証明されれば、その産業応用である創薬・診断を目的とした新規医薬品や試薬類の製品開発の加速が期待される。創薬においては、疾患における後天的修飾 (DNA メチル化、ヒストン修飾) 異常の解析から見出される標的に対して、**first-in-class** となる画期的新薬開発も期待される。

#### 2. 研究開発の具体的内容

##### (1) 後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発

研究開発項目①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術をベースとして、標的分子に対する後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析する手法を開発するとともに、多数の試験サンプルに対して適応可能な、高感度かつ高精度なハイスループットアッセイ法を構築する。

##### (2) 探索的実証研究

*in silico* 化合物スクリーニング等の IT 技術とともに天然化合物ライブラリ等も活用して、後天的ゲノム修飾と複数種類の癌とを関連づける複数の創薬・診断の標的候補分子に対し、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を高感度かつ高精度な定量的アッセイ法を用いて複数個程度同定し、モデル生物等による検証も通じて標的としての妥当性を検証することによって、本事業で開発した後天的ゲノム修飾に着目した創薬基盤技術の有用性を実証する。

#### 3. 達成目標

##### 【最終目標 (平成 26 年度末)】

研究開発項目②で選定した 15 個程度の創薬・診断標的候補分子に対する高感度なハイスループットアッセイ法を構築し、そのうち 5 種類の標的候補分子について創薬・診断の指標としての妥当性を実証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。

##### 【中間目標 (平成 24 年度末)】

研究開発項目②で探索した 5 個程度の創薬・診断標的候補分子に対するハイスループットアッセイ法を構築し、そのうち 2 種類の標的候補分子について創薬・診断の指標としての妥当性を実証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を確認する。

以上

## 平成 24 年度実施方針

## 平成24年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心イノベーションプログラム  
(大項目) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

## 2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第2号

## 3. 背景及び目的・目標

現在の医薬品開発においては、副作用が少なく効果的な薬の開発のため、ゲノム情報を活用した創薬研究が主流となってきている。創薬における研究開発費が1物質当たり500億円を超え増加の一途をたどる一方で、新薬上市件数は低下するという世界的傾向の中、創薬研究の効率を上げ、研究開発リスクを低減させることが喫緊の課題となっている。医薬産業政策研究所「製薬産業の将来像」によれば、創薬プロセスにおけるボトルネックの一つとして、標的分子候補と疾病の関係を推定し新薬の目標を確定する「ターゲットバリデーション」が挙げられており、画期的な新薬を生み出すためには、基礎研究の進展に伴う新しい知見を取り込み、新規メカニズムに基づく創薬標的分子を同定していくことが重要である。

近年のギガシーケンサー及び高精度質量分析装置等の解析技術の急速な進展により、後天的ゲノム修飾が疾患等の原因として重要な因子であることが相次いで明らかになり、世界中の研究者の注目を集めている。後天的ゲノム修飾は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。技術戦略マップ2009(平成21年4月経済産業省策定)においても、後天的ゲノム修飾の解析は、波及効果が高く、「画期的な医薬品の開発」、「医薬品開発の効率化」に資する重要技術として位置づけられている。

しかし、後天的ゲノム修飾の解析等の技術開発は世界最先端の分野であり、後天的ゲノム情報と疾患との関連は未だに一部を除いては解明されておらず、解明に必要となる臨床情報の付随した検体の入手も困難である。また研究を開始するためには、高精度な解析技術や情報処理技術等、後天的ゲノム解析のための先進的技術導入や専門の人材の育成等に莫大な時間と投資が必要であり、民間企業等が独自に研究を進めるのは極めてリスクが高い。このため米国では、NIH(国立衛生研究所)のロードマップの一つに位置づけ、2008年より5年間で総額1億9000万ドルを超えるプロジェクトを、大学・研究機関を中核として開始している。我が国においても、企業・研究者・臨床家の連携の下に一体的なオープンイノベーションを可能とする世界トップレベルの産学連携体制を構築し、最適な技術・情報基盤を確立するためには、国の支援が不可欠である。

本事業では、企業ニーズを取り入れ、参画企業とともに疾患の原因となる後天的ゲノム修飾の効果的・効率的解析手法の開発を行い、後天的ゲノム修飾を高感度で検出するシステムを構築するとともに、複数種類の癌との関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発し、後天的ゲノム修飾に起因する複数種類の癌に対し、後天的ゲノム修飾を制御する分子等を用いた探索的実証研究を通じて、基盤技術としての有用性を検証する。

これにより、プロジェクト期間中に最先端の技術を、学から民へと移転をするとともに、創薬ターゲットとなりうる後天的ゲノム修飾が解析されれば、企業による医薬品開発が加速され、20数年後には、1製品あたり売上高が1000億を超えるブロックバスターと呼ばれる医薬品の導出も期待される。さらに将来、個人の後天的ゲノム情報に基づいて疾患の個体差や進行度に応じた標的治療薬による質と費用対効果の高い治療が実現されれば、国民の健康の維持・増進や創薬産業等のイノベーション、医療財政の負担軽減、我が国の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。

なお本研究開発は、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。

#### (1) 最終目標(平成26年度末)

後天的ゲノム修飾を現状の100倍程度の高感度高精度で解析する技術、および解析データの標準的情報処理技術を確立する。

これらの解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける創薬・診断標的候補分子を選定する。

候補分子を制御する因子を用いて創薬・診断標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。

#### (2) 中間目標(平成24年度末)

後天的ゲノム修飾を現状の10倍程度高感度で解析できる技術、解析データの情報処理技術を開発する。

開発した解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける創薬・診断標的候補分子を探索する。

候補分子を制御する因子を用いてその妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を確認する。

### 4. 事業内容

東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野・油谷浩幸教授をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施した。

#### 4.1 平成23年度委託事業内容(成果)

##### 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

ヒストン修飾解析等に必要となる多種類の解析用抗体からなる抗体パネルを作成し、後天的疾患に由来する複数種類の癌のヒト臨床サンプルおよび代表的なヒト正常細胞を対象として、多種類のヒストン修飾や修飾因子を系統的にマッピングする技術を開発する。また、質量分析法等を用いて、後天的ヒストン修飾の組み合わせコード(アセチル化、リン酸化、メチル化修飾の組み合わせを判定)を測定するための解析基盤技術を構築するとともに、解析に必要な検体の微量化を実現する高感度解析技術を開発する。そのため以下のとおり実施した。

##### 【実施項目】

##### ①DNAメチル化の網羅的解析技術開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

全ゲノムバイサルファイトショットガンシーケンス法(WGBS法、PBAT法)を導入し、データ解析パイプラインの整備を行った。DNA脱メチル化反応に関わるDNAハイドロキシメチル化の検出に関しては、抗ハイドロキシメチルシトシン抗体による免疫沈降法を用いた網羅的検出系を確立した。

##### ②高感度エピゲノム解析技術開発(東京大学、東京大学分生研、エピゲノム技術研究組合)

微量なChIP検体の増幅法の開発に着手した。また、微量検体からの染色体分離法について検討を行った。

##### ③修飾ヒストン抗体パネルの研究開発(大阪大学、東京大学、エピゲノム技術研究組合)

修飾ヒストン特異的モノクローナル抗体の親和性に関する検討を、BIACORE及びFRAPアッセイにより行った。

##### ④ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所)

80近くのヒストンH4テールの修飾組み合わせパターンの分離が可能となり、1 $\mu$ g以下のヒストンタンパク質を用いて、H4テールの修飾パターンの時系列変化を比較定量できる技術を開発した。ChIPで得たタンパク質を質量分析計で解析するための条件を決定した。

ヒストンH3テールの修飾組み合わせの検出が可能になり、定量的に検出するための反応条件の検討に着手した。

##### (2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所)

後天的疾患を有する臓器の後天的ゲノム修飾を解析して得られる膨大な情報と既存の生命情報データを統合し、取得データから必要な情報を効率的に抽出し可視化するため、IT技術等を活用した新たな標準的情報処理技術を開発する。そのため以下のとおり実施した。

##### 【実施項目】

RNA-seq解析パイプラインの改良を行い、スプライスジャンクションの予測精度を改善した。ヒトの16組織におけるトランスクリプトームデータから新規ノンコーディング転写産物を予測し、個々の転写産物のID付けを行った。予測結果はデータベースに登録し、東京大学先端研グループと共有した。  
改良したRNA-seq解析パイプラインをデータベースに登録し、解析の最終結果だけでなく中間結果についても共有し、検証できるようにした。

#### 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

##### (1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

どのような後天的ゲノム修飾の変化によってどのような後天的疾患が発生するか、疾患と後天的ゲノム修飾の関連づけを行う。

解析対象となる複数種類の癌のヒト臨床サンプルを効率的に収集し、上記①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術等も活用して、後天的ゲノム修飾の組み合わせの解析等により得られる情報基盤を用いて疾患と正常の比較分析を行うことにより、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を探索するとともに、新たな創薬・診断の標的候補分子を同定する。そのため以下のとおり実施した。

##### 【実施項目】

##### ①臨床検体の収集と病理解析(東京大学、東京大学人体病理学)

累積で計60例(胃癌20例、肺癌20例、肝癌20例)の腫瘍組織から検体採取を行うとともに、体系的にDNA、RNAの抽出、精製を行った。高悪性度、難治性腫瘍に対する新規の標的探索という目的に鑑み、腫瘍の転移が高頻度に見られる肺及び肝臓に関しては、転移、再発を含めたすべての腫瘍性病変のバンキングも同時に進めた。これらの癌種について、癌特異的タンパク質及び核酸の発現評価を迅速に行うため、組織アレイの構築を開始した。

##### ②xenograft パネルの研究開発(東京大学、がん研究会)

昨年度作成した膵癌、胃癌 xenograft に続き、膵癌、胃癌の転移例を含む direct xenograft の作成を進めた。

##### ③エピゲノム変異発癌モデルの研究開発(東京大学、東京大学消化器内科、京都大学)

発がんモデル実験を行うため、G9aコンディショナルKOマウスおよびJhdm2aKOマウスを東大消化器内科に送付し、これらのKOマウスを確保するための交配実験を継続し、一部のモデルについては解析の準備を進めた。

また、新たなエピゲノム制御不全性発がんモデル確立のため、PRDMファミリー遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作成を試みた。ノックアウトベクターの導入を確認し、交配を開始した。

##### ④エピゲノム修飾の特異性を規定する非コードRNA機能の研究開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所、協和発酵キリン)

発癌関連因子として注目されているエピゲノム制御複合体が、非コードRNAと共に核内巨大複合体形成に必要なことを明らかにした。ヒト癌細胞株のRNA-Seqによるトランスクリプトーム解析を実施し、機能性非コードRNA候補選抜を実施した。

##### ⑤癌診断メチル化マーカーに関する研究開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

11種の癌組織および正常組織・細胞に関する27Kエピジェノタイピングアレイのデータマイニングを行い、各癌腫の診断に有用な特異的マーカーを選出し、検出方法を確立した。より高解像度である450Kエピジェノタイピングアレイを用いて、癌組織と非癌部組織のデータ取得を行い、高感度かつ高特異的なマーカーの選出に着手した。

##### ⑥癌細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発(東京大学、東京大学消化器内科、エピゲノム技術研究組合)

肺癌細胞株におけるヒストン修飾異常を解析した。ヒストン修飾酵素およびDNAメチル化修飾酵素のshRNAノックダウンによる表現型解析、及びヒストン修飾の変動を調べるとともに、酵素活性測定系の樹立を進めた。

#### 研究開発項目③「探索的実証研究」

##### (1) 後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

上記①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術をベースとして、標的分子に対する後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析する手法を開発するとともに、多数の試験サンプルに対して適応可能な、高感度かつ高精度なハイスループットアッセイ法を構築する。そのため以下のとおり実施した。

##### 【実施項目】

項目①で開発した技術の検証のため、従来法である抗体を用いたウェスタンブロット法を用いて、培養細胞の細

胞周期におけるヒストンH4の修飾組み合わせの解析に着手した。

質量分析計によるヒストンメチル化活性のスクリーニングに加え、 $\alpha$ -スクリーニング法を用いた活性測定法の開発に着手した。

(2) 探索的実証研究(東京大学、エピゲノム技術研究組合、未来創薬研究所)

in silico 化合物スクリーニング等のIT技術とともに天然化合物ライブラリ等も活用して、後天的ゲノム修飾と複数種類の癌を関連づける複数の創薬・診断の標的候補分子に対し、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を高感度かつ高精度な定量的アッセイ法を用いて複数個程度同定し、モデル生物等による検証も通じて標的としての妥当性を検証することによって、本事業で開発した後天的ゲノム修飾に着目した創薬基盤技術の有用性を実証する。そのため以下のとおり実施した。

**【実施項目】**

2回目の in silico スクリーニングで得られた約200化合物の in vitro スクリーニングにより、さらに阻害活性の高い化合物を得た。化合物とメチル化酵素との共結晶化に成功し、X線結晶構造解析のための条件検討に着手した。

ヒストンH3K9メチル化酵素G9aの in silico および in vitro 阻害剤スクリーニングを行った。

複数の酵素について天然物ライブラリースクリーニング、阻害ペプチドライブラリースクリーニングに着手し、活性のあるタンパク質、タンパク質複合体の精製を行った。

研究開発項目④「総合調査研究」(エピゲノム技術研究組合)

エピゲノム技術開発研究に関わる、研究促進のための活動を中心とし、国内外の技術動向調査及び情報収集を行う。特に、進歩が目覚ましい次世代シーケンサーや質量分析技術の進展は、研究開発項目①②と密接に関係しており、この技術動向は、今後のプロジェクト戦略を考える上で必要であるので、主たる調査研究として実施する。また、本プロジェクト実施内容に関連する外部動向調査(エピゲノム解析やメチル化酵素阻害などの阻害剤開発動向)を継続的に行っていくことも必要となる。そのため以下のとおり実施した。

**【実施項目】**

エピゲノム修飾酵素阻害剤の医薬品状況を調査した。日本新薬が申請したDNAメチル化阻害剤NS-17(一般名:アザシチジン)が骨髄異形成症候群(MDS)治療薬として日本で承認された。エーザイが、DNAメチル化阻害剤デシタピン(商品名:Dacogen)の骨髄異型性症候群(MDS)に対する5日間投与法の追加承認を、米食品医薬品局(FDA)から獲得した。

## 4. 2実績推移

	H22年度	H23年度
	委託	委託
実績額推移 (百万円)		
一般勘定(交付金):	273	445
特許出願数 (件)	0	0
論文発表数 (報)	7	25
フォーラム等 (件)	12	14

## 5. 事業内容

### 5.1 平成24年度事業内容(計画)

東京大学先端科学技術研究センター油谷浩幸教授をプロジェクトリーダーとし、先進的なエピゲノム修飾解析技術および質量分析技術を有する東京大学先端科学技術研究センターを集中研とするオープンラボを中核に、医療機関および製薬・診断企業が構成するエピゲノム技術研究組合が参加する研究体制によって推進する。

研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

ヒストン修飾解析等に必要となる多種類の解析用抗体からなる抗体パネルを作成し、後天的疾患に由来する複数種類の癌のヒト臨床サンプルおよび代表的なヒト正常細胞を対象として、多種類のヒストン修飾や修飾因

子を系統的にマッピングする技術を開発する。

また、質量分析法等を用いて、後天的ヒストン修飾の組み合わせコード(アセチル化、リン酸化、メチル化修飾の組み合わせを判定)を測定するための解析基盤技術を構築するとともに、解析に必要な検体の微量化を実現する高感度解析技術を開発する。

#### 【実施項目】

##### ①DNAメチル化の網羅的解析技術開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

全ゲノムバイサルファイトショットガンシーケンス法(WGBS法、PBAT法)により、ヒト癌組織のDNA異常メチル化を1塩基レベルで解析する。さらに、DNA脱メチル化に関与するヒドロキシメチル化についても、より高解像度な網羅的解析法の確立を目指す。

##### ②高感度エピゲノム解析技術開発(東京大学、東京大学分生研、エピゲノム技術研究組合)

微量検体からのChIP解析プロトコルのうち、特に染色体の可溶化プロトコルについて重点的に検討する。また、パーソナル型シーケンサーの導入により、改良プロトコルの評価を迅速化する。

##### ③修飾ヒストン抗体パネルの研究開発(大阪大学、東京大学、エピゲノム技術研究組合)

モノクローナル抗体の親和性と修飾の組み合わせの認識について、FRAPやELISAによる測定を行う。それらの抗体を用いて、ヒストン修飾レベルを少数細胞で評価する系を開発する。また、抗体を大量に精製し、供給する。

##### ④ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所)

新規導入した質量分析計を用いて、検出したH4テール組み合わせの信頼性検証を行う。さらなる高感度化を行い、ChIPで共沈降されるヒストンテールの修飾組み合わせの解析を目指す。SRMによる定量法の高精度・高感度化を行う。

ヒストンH3テールについても、H4テールと同様の解析技術を確立する。

#### (2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所)

RNA-seq解析パイプラインによる新規ノンコーディング転写産物の予測について、既存研究の結果をもとに改良を行う。

エピゲノム情報に特化した独自の検索・可視化工具を開発・改良するとともに、プロジェクトで取得した組織・疾患別転写情報、DNAメチル化情報、ヒストン修飾情報を体系的に収納するためのデータベースを開発する。

#### 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

どのような後天的ゲノム修飾の変化によってどのような後天的疾患が発生するか、疾患と後天的ゲノム修飾の関連づけを行う。

解析対象となる複数種類の癌のヒト臨床サンプルを効率的に収集し、上記①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術等も活用して、後天的ゲノム修飾の組み合わせの解析等により得られる情報基盤を用いて疾患と正常の比較分析を行うことにより、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を探索するとともに、新たな創薬・診断の標的候補分子を同定する。

#### 【実施項目】

##### ①臨床検体の収集と病理解析(東京大学、東京大学人体病理学)

胃癌、肺癌、肝癌、胆膵癌を中心に、30例程度(累積計90例)の腫瘍組織からの検体採取を行うとともに、体系的にDNA及びRNAの抽出・精製を行う。またこれらの癌種について、癌特異的タンパク質、核酸の発現評価を迅速に行うための組織アレイの構築を行う。

##### ②xenograft パネルの研究開発(東京大学、がん研究会)

膵癌、胃癌の転移例を含む、direct xenograft および細胞株の樹立を継続する。

##### ③エピゲノム変異発癌モデルの研究開発(東京大学、東京大学消化器内科、理化学研究所)

肝癌/膵癌発症モデルマウスとG9aあるいはJhdm2a欠損マウスの掛け合わせによるがん発症実験を継続し、その解析に着手する。さらに、PRDM改変マウスを用いて、PRDMのがん発症における役割について検討する。

##### ④エピゲノム修飾の特異性を規定する非コードRNA機能の研究開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合、産業技術総合研究所、協和発酵キリン)

ヒト癌細胞株および臨床腫瘍検体のRNA-seqによる解析を実施し、機能性非コードRNA候補の選抜を行う。非コードRNAとエピゲノム関連複合体との相互作用解析や機能阻害解析を実施する。

##### ⑤癌診断メチル化マーカーに関する研究開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

450Kエピジェノタイプピングアレイを用いて、手術検体における癌組織と非癌部組織のプロファイルを比較し、

癌組織に特異的な異常メチル化マーカーの同定を行う。ヒト血液検体を用いて、選抜した診断マーカーの検出に着手する。

⑥癌細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発(東京大学、東京大学消化器内科、エピゲノム技術研究組合)

大腸癌、胃癌、肺癌などの癌細胞株を中心に、主要なヒストン修飾変異の有無およびDNAメチル化の修飾状態の変化を検討する。さらに、これらの修飾を制御する標的候補遺伝子に対するshRNAを用いた、癌細胞株における表現型解析を行う。タンパク質複合体解析等を通じ、協働して作用するタンパク質等を同定することにより、エピゲノム修飾の制御システムを解明し、新たな創薬診断の標的候補分子を同定する。

研究開発項目③「探索的実証研究」

後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発(東京大学、エピゲノム技術研究組合)

上記①で開発される後天的ゲノム修飾解析基盤技術をベースとして、標的分子に対する後天的ゲノム修飾を再現性よく定量的に解析する手法を開発するとともに、多数の試験サンプルに対して適応可能な、高感度かつ高精度なハイスループットアッセイ法を構築する。

【実施項目】

細胞周期でのヒストンH4テールの修飾組み合わせ検出の高精度化のため、SRMでのH4テール定量の高感度化と、複数の修飾組み合わせパターンの同時検出技術を確立する。

In silico 阻害剤スクリーニングと in vitro アッセイに加えて、天然物ライブラリースクリーニングや阻害ペプチドライブラリースクリーニングの系を確立し、さらなるハイスループット化を行う。

項目①で検討中のH3テール解析技術を用いて、H4テール解析に用いた試料の解析を行い、解析手法の検証を行う。

(2) 探索的実証研究(東京大学、エピゲノム技術研究組合、未来創薬研究所)

in silico 化合物スクリーニング等のIT技術とともに天然化合物ライブラリ等も活用して、後天的ゲノム修飾と複数種類の癌を関連づける複数の創薬・診断の標的候補分子に対し、これらの標的候補分子の後天的ゲノム修飾を制御する因子を高感度かつ高精度な定量的アッセイ法を用いて複数個程度同定し、モデル生物等による検証も通じて標的としての妥当性を検証することによって、本事業で開発した後天的ゲノム修飾に着目した創薬基盤技術の有用性を実証する。

【実施項目】

メチル化酵素と阻害活性化合物を共結晶化し、X線結晶構造解析を行い、さらに高い阻害活性を持つ化合物の設計を目指す。共結晶が得られた化合物について、化合物投与時のがん細胞株の細胞生物学的解析、質量分析計によるターゲット修飾の解析により、化合物評価法としての妥当性を評価する。

数種の標的候補分子について、天然物ライブラリースクリーニングと阻害ペプチドライブラリースクリーニングを平行して実施することにより複数の手法の比較検証を行い、その妥当性を評価する。

アッセイ系構築に用いることのできる活性を保持した酵素タンパク質を用いて、モノクローナル抗体作成を継続する。

研究開発項目④「総合調査研究」(エピゲノム技術研究組合)

エピゲノム技術開発研究に関わる、研究促進のための活動を中心とし、国内外の技術動向調査及び情報収集を行う。特に、進歩が目覚ましい次世代シーケンサーや質量分析技術の進展は、研究開発項目①②と密接に関係しており、この技術動向は、今後のプロジェクト戦略を考える上で必要であるので、主たる調査研究として実施する。また、本プロジェクト実施内容に関連する外部動向調査(エピゲノム解析やメチル化酵素阻害などの阻害剤開発動向)を継続的に行っていくことも必要となる。

【実施項目】

次世代シーケンサーの技術開発動向とエピゲノム修飾酵素の阻害剤開発状況の調査を引き続き行う。

とりわけ、長いリード長、早い反応時間を特徴とする解析プラットフォームについて評価を続けると共に、ナノポアシーケンシングの研究動向についても注視する。また、エピゲノム関連研究として遺伝子変異解析とがん細胞集団の異質性に着目した研究を調査する。

5.2 平成24年度事業規模  
委託事業

一般勘定(交付金) 484百万円(継続)  
(注) 事業規模については、変動があり得る。

## 6. その他重要事項

### (1) 評価の方法

NEDOは、技術的および政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成24年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ、必要に応じ、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

### (2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成16年 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「産業経済分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成16年12月17日 経済産業省)等を厳守する。

## 7. スケジュール

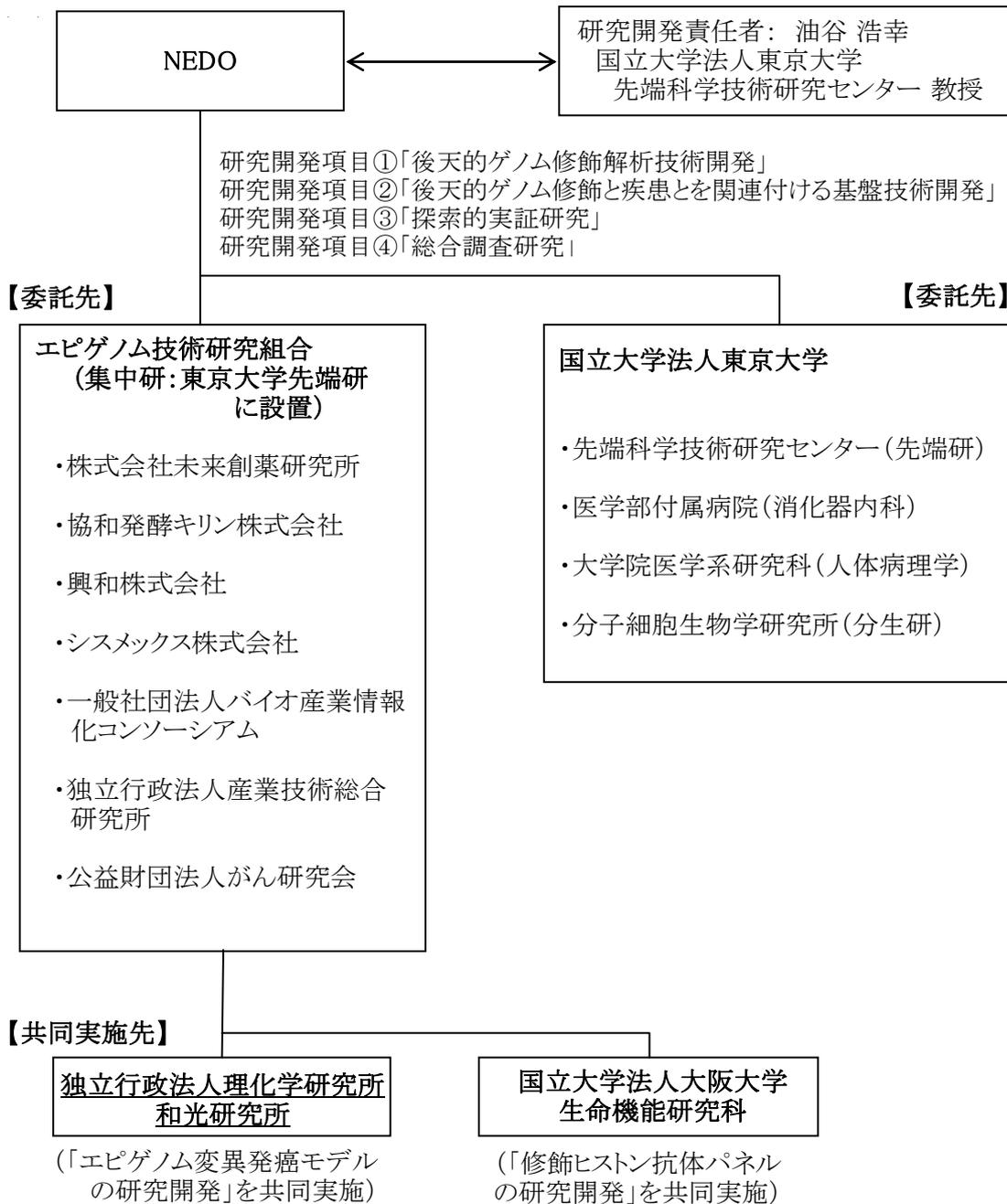
平成24年 6～7月	中間評価分科会
平成24年 9～10月	プロジェクト運営会議
平成25年 2～3月	プロジェクト運営会議

## 8. 実施方針の改訂履歴

(1) 平成24年3月1日、制定。

(別紙) 実施体制図

「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」



## 事前評価関連資料

- ・ 事前評価書
- ・ パブリックコメント募集の結果について

事前評価書

	作成日	平成 22 年 3 月 2 日
1. 事業名称	革新的な医療機器・創薬等の開発 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1)概要：医薬品開発や診断を効率的に行うため、疾患原因となるゲノムの後天的修飾（後天的な遺伝子変化）を解析する技術や疾患との関連づけを行う手法の開発等を行うことを目的に、以下の研究開発を実施する。</p> <p>①後天的ゲノム修飾解析技術開発 ②後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける基盤技術開発 ③探索的実証研究</p> <p>(2)事業規模：平成 22 年度 3.2 億円（予定） (3)事業期間：平成 22 年度～26 年度（5 年間）</p>	
4. 評価の検討状況	<p>(1)事業の位置付け・必要性</p> <p>①事業の位置付け 個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。</p> <p>②必要性 現在の医薬品開発においては、副作用が少なく効果的な薬の開発のため、ゲノム情報を活用した創薬研究が主流となってきている。創薬における研究開発費が 1 物質当たり 500 億円を超え増加の一途をたどる一方で、新薬上市件数は低下するという世界的傾向の中、創薬研究の効率を上げ、研究開発リスクを低減させることが喫緊の課題となっている。医薬産業政策研究所「製薬産業の将来像」によれば、創薬プロセスにおけるボトルネックの一つとして、標的分子候補と疾病の関係を推定し新薬の目標を確定する「ターゲットバリデーション」が挙げられており、画期的な新薬を生み出すためには、基礎研究の進展に伴う新しい知見を取り込み、新規メカニズムに基づく創薬標的分子を同定していくことが重要である。</p>	

## (2)研究開発目標の妥当性

近年のギガシーケンサー及び高精度質量分析装置等の解析技術の急速な進展により、後天的ゲノム修飾が疾患等の原因として重要な因子であることが相次いで明らかになり、世界中の研究者の注目を集めている。後天的ゲノム修飾は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。

本事業では、疾患の原因となる後天的ゲノム修飾の効果的・効率的解析手法の開発を行い、後天的ゲノム修飾を高感度で検出するシステムを構築するとともに、複数種類の癌との関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発する。さらに、後天的ゲノム修飾に起因する複数種類の癌に対し、後天的ゲノム修飾を制御する分子等を用いた探索的実証研究を通じて、基盤技術としての有用性を検証する。

## (3)研究開発マネジメント

公募により最適な研究開発体制を構築する。研究体には、NEDO が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究開発項目毎にサブ・プロジェクトリーダーを置くとともに、研究者を結集し、集中研究方式にて効率的な研究開発を実施する。

外部有識者から構成される研究開発推進委員会（仮称）を設け、委員会を年 2 回開催するとともに、必要に応じて開発テーマ毎の分科会を適宜開催し、研究開発の進捗管理を行うとともに、進捗状況を踏まえた予算配分や事業計画の策定を行う。

## (4)研究開発成果

後天的ゲノム修飾を現状の 100 倍程度の高感度高精度で解析する技術、および解析データの標準的情報処理技術を確立する。

これらの解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける創薬・診断標的候補分子を選定する。

候補分子を制御する因子を用いて創薬・診断標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。

## (5)実用化・事業化の見通し

プロジェクト期間中に最先端の技術を、学から民へと移転をするとともに、創薬ターゲットとなりうる後天的ゲノム修飾が解析されれば、企業による医薬品開発が加速され、20 数年後には、1 製品あたり 1000 億を超えるブロックバスターと呼ばれる医薬品の導出も期待される。さらに将来、個人の後天的ゲノム情報に基づいて疾患の個体差や進行度に応じた標的治療薬による質と費用対効果の高い治療が実現されれば、国民の健康の維持・増進や創薬産業等のイノベーション、医療財政の負担軽減、我が国の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。

## (6)その他特記事項

特になし。

## 5. 総合評価

創薬プロセスにおけるボトルネックとされている疾患標的分子の同定に資すると期待される、疾患等の原因として重要な因子である「後天的ゲノム修飾」の解析に必要な基盤技術開発を行うものである。各種の医薬品産業の将来調査や米国等海外での大規模プロジェクト実施の動きに合致するとともに、産業界からの要望も高く、かつ、広く産業全体に寄与する基盤技術であることから、ナショナルプロジェクトとして実施する意義は高い。また、これまでの NEDO プロジェクト成果の活用によって、本事業の効率的かつ円滑な推進が見込まれる。

以上のことから、NEDO が実施する事業として適切であると判断する。

「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発基本計画（案）」に対する  
パブリックコメント募集の結果について

平成 22 年 3 月 24 日

N E D O

バイオテクノロジー・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。

お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。

みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間

平成 22 年 3 月 5 日～平成 22 年 3 月 18 日

2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞

計 1 件

3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
<p>(別紙) 研究開発計画</p> <p>以下、主要なご意見の抜粋。</p> <p>研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・医療応用を目指した高精度・高信頼性をもつ解析装置の開発にも取り組んではどうか。</li> <li>・新たに開発する抗体については、国内外で標準的抗体として使用されるようになることを目指すべき。</li> </ul> <p>研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・「癌」での基盤構築・実証研究を行うことで、その他の後天的疾患における後天的ゲノム修飾異常の研究を加速する、と明記してはどうか。</li> <li>・疾患そのものとの関連づけにとどまらず、疾患発症に先行する変化も解明することで、発癌リスク診断・発癌予防への応用の基盤も構築してはどうか。</li> </ul>	<p>(別紙) 研究開発計画全般にわたり、具体的かつ詳細なご意見を多数頂戴し、誠にありがとうございました。</p> <p>新たな解析装置等機器開発の重要性、「癌」での基盤構築・実証研究を先鞭とした他の後天的疾患の研究の重要性、発癌リスク診断・発癌予防への応用基盤構築の重要性はいずれも認識しておりますが、開発予算や開発期間に限りがあることから、今回は取り組まないこととします。</p> <p>なお、基本計画中に新たに、「(2) 研究開発の目標、①過去の取り組みとその評価」という項目を設定し、平成 19 年度に NEDO が実施した調査結果のまとめを明記する形で、機器装置開発、他の後天的疾患研究の重要性について、反映させることとします。</p> <p>新たに作成する抗体の有用性検証はご指摘の通りで、新規開発の抗体も活用して、解析技術の全体的な高感度化を目指す目標設定としております。</p>	<p>[反映の有無と反映内容]</p> <p>平成 19 年度に NEDO が実施した「エビジェネティクスに関する研究動向及び産業応用への課題に関する調査」の結果まとめを引用する形で、一部のご意見を反映いたします。</p>

以上

## 特許・論文・学会発表リスト

### 【特許】

番号	出願者	出願番号	国内 外国 PCT	出願日	状態	名 称	発明者
1	シスメック (株) 東京大学	特願 2012-044324	国内	2012/2/29	出願	肝細胞癌由来の癌細胞の存否の判定方法	永江玄太 他

### 【論文（査読付き）】

1. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.* 2012 Feb 9.
2. Midorikawa Y, Tsuji S, Takayama T, Aburatani H. Genomic approach towards personalized anticancer drug therapy. *Pharmacogenomics.* 13(2):191-9. 2012
3. Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Research* 22(2):208-19. 2012
4. Yagi K, Takahashi H, Akagi K, Matsusaka K, Seto Y, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A. Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma. *Am J Pathology* 180(2):616-25. 2012
5. Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, Yagi K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama Y, Aburatani H. Potential responders to FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis. *Br J Cancer.* 106(1):126-32. 2012
6. Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. *PLoS Genetics* 7(11):e1002359. 2011
7. Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T. Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. *PLoS Genetics* 7(10):e1002311. 2011
8. Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H. DNA Methylation Profiling of Embryonic Stem Cell Differentiation into the Three Germ Layers. *PLoS ONE* 6(10): e26052. 2011
9. Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res.* 71(23):7187-97. 2011
10. Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K. ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 39(20):8712-27. 2011
11. Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y,

- Fukayama M, Saito N, Miyazono K, Aburatani H. Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(30):12384-9. 2011
12. Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, Ninomiya H, Inamura K, Ishikawa S, Ushijima M, Matsuura M, Jones MH, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani H. ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis. *Lung Cancer*. 75(1):119-25. 2012 [Epub 2011 Jul 6.]
  13. Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S. Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: Possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res*. 2011 Jul 6. doi: 10.1002/jbmr.464. [Epub ahead of print]
  14. Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro JI, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Minami T. Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *EMBO J*. 30(13):2582-95. 2011
  15. Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H. Cell-type specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 and hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 286(34):29848-60. 2011
  16. Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet*. 20(16):3188-97. 2011
  17. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H. Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res*. 71(13):4628-4639. 2011
  18. Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshiba S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet*. 20(14):2710-21. 2011
  19. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*. 43(5):464-9. 2011
  20. Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T. Marked induction of c-Maf during Th17 differentiation and its implication in memory Th cell development. *J Biol Chem*. 2011 Mar 14. [Epub ahead of print]
  21. Fujiwara M, Kashima TG, Kunita A, Kii I, Komura D, Grigoriadis AE, Kudo A, Aburatani H, Fukayama M. Stable knockdown of S100A4 suppresses cell migration and metastasis of osteosarcoma. *Tumour Biol*. 2011 Mar 1. [Epub ahead of print]
  22. Ouchi Y, Baba Y, Koso H, Taketo MM, Iwamoto T, Aburatani H, Watanabe S.  $\beta$ -Catenin signaling regulates the timing of cell differentiation in mouse retinal progenitor cells. *Tumour Biol*. 2011 Mar 1. [Epub ahead of print]
  23. Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K. Transforming growth factor- $\beta$  decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene*. 2010

24. Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, Aburatani H, Naito M, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T., Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors., *J Biol Chem*. 286(1):674-86. 2011
25. Akimoto C, Ueda T, Inoue K, Yamaoka I, Sakari M, Obara W, Fujioka T, Nagahara A, Nonomura N, Tsutsumi S, Aburatani H, Miki T, Matsumoto T, Kitagawa H, Kato S., Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors., *Natl Acad Sci U S A*. 107(46):19891-6. 2010
26. Shinoe T, Kuribayashi H, Saya H, Seiki M, Aburatani H, Watanabe S., Identification of CD44 as a cell surface marker for Müller glia precursor cells., *Neurochem*. 115(6):1633-42. 2010
27. Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H., Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of the otocyst., *J Comp Neurol*. 518(23):4702-22. 2010
28. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T., Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism., *Mol Cell Biol*. 30(24):5636-48. 2010
29. Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T., Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas., *Am J Pathol*. 177(5):2191-204. 2010
30. Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S., Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells., *Oncogene*. 30(5):619-30. 2011
31. Aburatani H., Cancer genome analysis through next-generation sequencing., *Gan To Kagaku Ryoho*. 2011 Jan;38(1):1-6.
32. 永江玄太、油谷浩幸、メチル化 DNA の解析～DNA メチル化解析のパイプラインと MeDIP-Seq 法、改訂第 5 版 実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック(2010 年 11 月)
33. 木村 宏、林 陽子. エピゲノム制御にかかわるヒストン修飾のイメージング. *医学のあゆみ* 235, 995-1000, 2010.
34. Bergmann JH, Rodríguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE, and Earnshaw WC. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J*. 30, 328-340, 2011.
35. Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res*. 39, 6475-6488, 2011.
36. Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, Kimura H, Ragoussis J, Teichmann SA, and Pombo A. Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ES cells. *Cell Stem Cell* 10, 157-170, 2012.
37. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T., The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis

- demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps., *Mol Cell Proteomics*. 2012 Jan 25. [Epub ahead of print] PMID: 22278372
38. Nomura M, Fukuda T, Fujii K, Kawamura T, Tojo H, Kihara M, Bando Y, Gazdar AF, Tsuboi M, Oshiro H, Nagao T, Ohira T, Ikeda N, Gotoh N, Kato H, Marko-Varga G, Nishimura T., Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. An FFPE proteomic study., *J Clin Bioinforma*. 2011 Sep 3;1(1):23.PMID: 21888658
  39. Kun Du, Shigeki Arai, Takeshi Kawamura, Akio Matsushita, Riki Kurokawa., TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation., *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jan 28;404(4):991-6. Epub 2010 Dec 25.
  40. Kato H, Nishimura T, Hirano T, Nomura M, Tojo H, Fujii K, Kawamura T, Mikami S, Kihara M, Bando Y, Tsuboi M, Ikeda N, Varga GM., A Clinician View of Proteomic Studies in the Light of the Experience in the Lung Cancer in Japanese Healthcare., *J Proteome Res*. 2010 Dec 8. [Epub ahead of print] 2011 Jan 7;10(1):51-7.
  41. Kudo Y, Tateishi K., et.al., Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation., *Cancer Sci*. 2012;103(4):670-6
  42. Ideue, T., Adachi, S., Naganuma, T., Tanigawa, A., Natsume, T., Hirose, T. U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 5693-5698 (2012).
  43. Miyagawa, R., Mizuno, R., Nakamura, Y., Ijiri, K., Rakwal, R., Shibato, J., Masuo, Y., Hirose, T., Akimitsu, N. Identification of the cis-acting and trans-acting determinants of noncoding RNA MALAT-1 for the nuclear speckles localization. *RNA* 18, 738-751 (2012).
  44. Nakagawa S, Hirose T. Paraspeckle nuclear bodies-useful uselessness? *Cell Mol Life Sci*. in press (2012)
  45. Kawaguchi, T., Hirose, T., Architectural roles of long noncoding RNAs in the intranuclear formation of functional paraspeckles. *Frontier in Bioscience*, 17, 1729-1746 (2012)
  46. Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, Hirose, T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J. Cell Biol.* 193, 31-39 (2011)
  47. Hirose, T. Gas5 gene. version 2. *Encyclopedia on Life Science*. e1-5 (2011)
  48. 廣瀬 哲郎 長鎖非コード RNA の性状と疾患への関与、*臨床検査* 55, 900-905 (2011)
  49. 廣瀬 哲郎 非コード RNA の新しい制御機能と疾患への関わり、*医学のあゆみ* 238, 400-406 (2011)
  50. 長沼 孝雄、廣瀬 哲郎 核内構造体形成を司る長鎖 ncRNA 、*実験医学* 29, 1736-1742 (2011)
  51. 井手上 賢、廣瀬 哲郎 培養細胞からの核酸抽出法、目的別で選べる核酸実験の原理とプロトコール、羊土社、152-158 (2011)
  52. Maeda D, Shibahara J, Sakuma T, Isobe M, Teshima S, Mori M, Oda K, Nakagawa S, Taketani Y, Ishikawa S, Fukayama M.  $\beta$ -catenin (CTNNB1) S33C mutation in ovarian microcystic stromal tumors. *Am J Surg Pathol*. 2011 Oct;35(10):1429-40.
  53. Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N, Shinozaki A, Umeda M, Ishikawa S, Kokudo N, Fukayama M. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2011 Oct;59(10):942-52.

#### 【学会発表】

1. Aburatani H., Epigenomic profiling., 2011 Illumina Scientific Summit (April 11-14,2011, Bali)
2. 油谷浩幸、多層的オミックス解析による診断と治療の標的分子の探索：その最新事情 ゲノム・エピゲノム解析、臨床応用を目指した最前線セミナーPart.12 (4.27.2011, 東京)

3. 油谷浩幸、「がんトランスレーショナル研究の最先端と病理」、エピゲノム修飾の包括的解析によるがん創薬・バイオマーカー探索、第100回日本病理学会総会シンポジウム (4.30.2011, 横浜)
4. 永江玄太、ゲノム・エピゲノム情報による症例送別化、第70回日本癌学会学術総会 (10.4.2011)
5. 永江玄太、細胞分化過程における低 CpG プロモーターの脱メチル化、第5回日本エピジェネティクス研究会年会 (5.19.2011)
6. 油谷浩幸、エピゲノム解析、日本エピジェネティクス研究会セミナー (5.19.2011, 熊本)
7. 油谷浩幸、がんゲノム解析、第16回東京肝臓シンポジウム (6.11.2011, 東京)
8. Aburatani H., Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma., International Symposium on Application of NGS on Genomics and Epigenomics (2011.6.27, 台北)
9. 油谷浩幸、がんエピゲノム創薬、第10回バイオテクノロジー国際会議 (6.30.2011, 東京)
10. 油谷浩幸、エピゲノム解析の現状と疾患解析、第26回北摂循環器研究会 (7.5.2011, 大阪)
11. 油谷浩幸、次世代エピゲノム解析、国立国際医療研究センターセミナー (7.6.2011, 新宿)
12. Aburatani H., Current Challenges & New Technologies., 5th ICGC Scientific Workshop (July 10–12, 2011, Kyoto)
13. Aburatani H., Regulatory genomics, IMSUT&RCAS GCOE symposium (7.15.2011, Tokyo)
14. 油谷浩幸、がんエピゲノム創薬、興和セミナー (8.11.2011, 東村山)
15. 油谷浩幸、次世代シーケンサーを用いた癌ゲノム解析：検体調製からデータ解析まで、第6回肺癌分子病態研究会 (9.3.2011, 東京)
16. 油谷浩幸、がんエピゲノム創薬、BioJapan2011 (10.6.2011, 横浜)
17. 油谷浩幸、パーソナルゲノム解析がもたらすがん予防・治療戦略、第61回日本体質医学会総会 (10.8.2011, 東京)
18. 油谷浩幸、エピジェネティクス・エピゲノムの研究最前線、バイオファイナンスギルド第10期第3回セミナー (10.14.2011, 東京)
19. 油谷浩幸、エピゲノム解析とゲノム医療、第29回千駄木内分泌懇話会 (10.20.2011, 東京)
20. Aburatani H., Genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency in pancreatic cancer., US-Japan Cancer Genomics and Epigenomics Workshop (October 24–26, 2011 – Kyoto)
21. Aburatani H., Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma, JSPS 164th committee 4th Kickoff Symposium (October 27, 2011, Tokyo)
22. 油谷浩幸、がんゲノム診断、第56回人類遺伝学会 シンポジウム 12 家族性腫瘍 (11.12.2011, 幕張)
23. 油谷浩幸、エピゲノム解析からせまる循環器研究、第11回 Cardiovascular Frontier Conference (11.19.2011, 東京)
24. Aburatani H., Cancer genomics and epigenomics, International Scientific Coordination Network (November 22–25, 2011 – Montpellier, France)
25. Aburatani H., Personalized oncology, FOCUS symposium (11.29.2011, Sendai)
26. 油谷浩幸、次世代ゲノム研究の最前線、2011次世代シーケンサーセミナー (11.30.2011 東京)
27. Aburatani H., Cancer genome sequencing, MBSJ2011 Workshop: Next generation molecular medicine (12.13.2011, Yokohama)
28. 油谷浩幸、次世代ゲノム研究の最前線、医科学政策研究会 (12.17.2011, 東京)
29. 油谷浩幸、肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて、第5回肝がん分子標的治療研究会 (1.14.2012, 東京)
30. 油谷浩幸、エピゲノム解析とトランスレーショナル研究、第10回がん・エピゲノム研究会 (1.18.2012, 仙台・東北大)
31. 油谷浩幸、パーソナルオンコロジーの実現へ向けて、ゲノムテクノロジー第164委員会沖縄分科

- 会 (1.25.2012, 那覇)
32. Aburatani H., Regularatory genomics, OIST seminar (1.26.2012, OIST)
  33. 油谷浩幸、エピゲノム解析の現状&心筋分化のエピゲノム・ダイナミクス、第5回 iPS 細胞・再生医学研究会 (2.3.2012, 京都大)
  34. 油谷浩幸、ヒドロキシメチルシトシンの局在解析、精神・神経疾患研究開発費 平成 23 年度シンポジウム (2/7.2012, 東京)
  35. 油谷浩幸、後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発、JBIC 研究成果報告会 (2.10.2012, 東京)
  36. Aburatani H., Methylation dynamics in cancer, The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference (Bethesda, 2.23.2012)
  37. 油谷浩幸、肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて、第6回新肝臓病研究会 (3.2.2012, 甲府)
  38. Aburatani H., Cancer Genomics to Drug discovery, Next Generation Sequencing Applications Asia (March 28-29, 2012, Singapore)
  39. 油谷浩幸、Pancreatic Cancer Exomes、第55回日本人類遺伝学会 (10.28.2010, 大宮) 招待講演
  40. 油谷浩幸、ゲノム・エピゲノム情報による症例層別化、第48回日本癌治療学会学術集会 JSCO-JCA joint symposium 招待講演 (10.29.2010, 京都)
  41. Aburatani H., Epigenomic analysis of liver cancer., 41th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Basic and Clinical Frontiers of cancer epigenetics 招待講演 (11.18.2010, Tokyo)
  42. 油谷浩幸、エピゲノム解析による疾病研究、第15回中国分子病態研究会招待講演 (11.27.2010, 岡山)
  43. 油谷浩幸、Chromatin marks in Transcriptional regulation, 第33回日本分子生物学会年会招待講演 (12.8.2010, 神戸)
  44. Aburatani H., Integrated genomic analysis of liver cancer, 3rd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Liver Cancer Research 招待講演 (3.3.2011, Maihama)
  45. 永江玄太、細胞分化過程における低 CpG プロモーターの組織特異的な脱メチル化、第33回日本分子生物学会年会 (12.9.2010, 神戸)
  46. Hiroshi Kimura., Small molecule screening for epigenetic modulators., Interdisciplinary approaches for the study of senescence. (Feb. 9,2012, Cambridge, UK)
  47. Tsubota, T. and Shinkai, Y., The role of H3K9 methyltransferase in genome integrity., 27th RBC-NIRS International Symposium. (December 9-10, 2011, Kyoto)
  48. 眞貝洋一、ヒストンメチル化酵素 ESET による生命機能制御、第11回日本分子生物学会春季シンポジウム (2011年5月26日、金沢)
  49. 眞貝洋一、ヒストンリジンメチル化による生命機能制御、がん研究所、2011年11月22日(東京)
  50. 眞貝洋一、ESET-mediated endogenous retrovirus silencing, 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム (2011年12月16日、横浜)
  51. T. Hirose, Multiple steps required for construction of nuclear paraspeckle on the specific long noncoding RNAs., 日本分子生物学会年会 (2011年12月16日、横浜)
  52. 廣瀬哲郎、非コード RNA の細胞内構造構築機能と疾患との接点、第84回日本生化学会大会シンポジウム (2011年9月21日、京都)
  53. Ideue, T., Adachi, S., Naganuma, T., Natsume, T., Hirose, T., U7 snRNP acts to repress histone gene transcription during cell cycle arrest through its new component hnRNP UL1, hnRNP UL1., RNA2011, (June 14, 2011, Kyoto)
  54. Kawaguchi, T., Naganuma, T., Sasaki, YF., Hirose, T, Functional analysis of SWI/SNF chromatin

- remodeling complexes in nuclear paraspeckle formation., RNA2011, 1, June 14, 2011, Kyoto
55. Naganuma, T., Nakagawa, S., Kawaguchi, T., Aoki, K., Sasaki, YF., Goshima, N., Hirose, T, MEN $\beta$  Noncoding RNA-dependent and -independent Steps Required for Nuclear Paraspeckle Formation., RNA2011, 1 (June 15, 2011, Kyoto)
  56. Naganuma, T., Sasaki, YF., Goshima, N., Hirose, T, Alternative 3' end processing of nuclear-retained long noncoding RNAs required for subnuclear body formation., RNA2011, 1, June 15, 2011, Kyoto
  57. Hirose, T., The building process of nuclear paraspeckles on the specific long noncoding RNAs., 第 63 回日本細胞生物学会 (2011.6.29、札幌)
  58. 山本信三、立石敬介、山本恵介、工藤洋太郎、宮林弘至、毛利大、浅岡良成、伊地知秀明、砂河孝行、油谷浩幸、小池和彦、大腸癌における H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C の発現異常とその意義の検討、第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会 2011 年 5 月 19 日 (熊本)
  59. 山本信三、立石敬介、山本恵介、工藤洋太郎、浅岡良成、伊地知秀明、池上恒雄、砂河孝行、油谷浩幸、小俣政男、小池和彦、大腸癌における H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C の発現異常とその意義の検討、Japan Digestive Disease Week 2011. (2011 年 10 月 20 日、福岡)
  60. 廣瀬哲郎、Noncoding RNA とタンパク質の特異的相互作用による核内構造体形成過程、第 33 回日本分子生物学会年会ワークショップ (2010 年 12 月 8 日、神戸)
  61. 川口哲哉、長沼孝雄、佐々木保典、廣瀬哲郎、核内パラスペックルに局在するクロマチン再構築因子の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 8 日、神戸)
  62. 長沼孝雄、中川真一、青木一真、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎、核内構造構築に必要な noncoding RNA の選択的 3' 末端プロセシングの分子機構、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 8 日、神戸)
  63. 谷川明恵、横井崇秀、佐々木保典、廣瀬哲郎、パラスペックル構造体を介して制御される核内繫留 mRNA の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7 日 (神戸)
  64. 迫田絵理、光山統泰、浅井潔、廣瀬哲郎、エクソソームによって分解される二次構造保存ゲノムシンテニー領域由来非コード RNA 群の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 7 日、神戸)
  65. 井手上賢、足達俊吾、夏目徹、廣瀬哲郎、U7 snRNP 新規構成タンパク質によるヒストン遺伝子の転写抑制機構、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 7 日、神戸)
  66. Tetsuro Hirose, Emerging functions of “modern” and “classical” noncoding RNAs in mammalian cells., 4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010; Dec. 1, 2010、岡崎)
  67. 白髭克彦、Visualizing histone modification dynamics in living cells., International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan.24, 2011、淡路)
  68. Hiroshi Kimura, Visualizing histone modification dynamics in living cells., International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan.26, 2011、淡路)
  69. Hiroshi Kimura, Live cell imaging of epigenetic histone modifications., 第 33 回日本分子生物学会年会 BMB2010 シンポジウム「エピゲノム情報のリードアウトと制御」(2010 年 12 月 8 日、神戸)
  70. 光山統泰、二次構造保存ゲノムシンテニー領域由来非コード RNA の予測、第 33 回日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 10 日、神戸)
  71. Nobuchika Suzuki, Takeshi Kawamura, Hiroko Iwanari, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Tohru Kozasa, The role of the G13~RH-RhoGEF signal pathway in differentiation of human myeloid HL60 leukemia cells., 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大 (2010.12.7-10、神戸)

以上