

「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析
技術開発プロジェクト」

事後評価第1回分科会 資料5

「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発/
細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」

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	i
プロジェクト用語集	x
I. 事業の位置付け・必要性について	1
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	1
1.1 NEDO が関与することの意義	
1.2 実施の効果（費用対効果）	
2. 事業の背景・目的・位置づけ	3
II. 研究開発マネジメントについて	5
1. 事業の目標	5
2. 事業の計画内容	5
2.1 研究開発の内容	
2.2 研究開発の実施体制	
2.3 研究の運営管理	
3. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメント	10
4. 情勢変化への対応	11
5. 中間評価結果への対応	13
6. 評価に関する事項	15
III. 研究開発成果について	16
1. 事業全体の成果	16
1.1 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発（産業技術総合研究所、 バイオインダストリー協会、癌研究会、協和発酵キリン、カネボウ化粧品、 東京大学、京都大学、山口大学）	16
1.2 リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発（アステラス製薬）	21
1.3 タンパク質導入法ならびに定量リン酸化プロテオーム解析による 細胞モニタリング技術の開発（エーザイ、岡山大学）	23
2. 研究開発項目毎の成果	25
2.1 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発	25
第1章 成果の概要	25
1－1 時系列解析技術開発	
1－2 デバイス関連技術開発	
1－3 応用研究	
第2章 時系列解析技術開発	31

2-1	時系列測定技術の必要性	31
2-2	時系列測定技術の開発 (産総研・CBRC、東大・三宅研)	33
2-3	時系列解析技術の開発 (微弱蛍光細胞時系列画像データの数值化 アルゴリズム開発) (産総研・CBRC、東大・三宅研)	38
2-4	時系列解析技術の開発 (細胞時系列データに基づく主要パス統計検定) (産総研・CBRC、東大・三宅研)	39
2-5	時系列データを用いたパスウェイ解析 (動態解析におけるパラメータ 推定精度の向上) (産総研・CBRC、東大・三宅研)	40
2-6	新規開発法のソフトウェア化 (産総研・CBRC)	45
2-7	パスウェイの理論的解析手法開発 (京大)	46
2-8	染色体変化による遺伝子発現の評価 (山口大、産総研・RICE つくば)	50
2-9	遺伝子発現の開始に関する評価技術 (東大・三宅研)	60
2-10	時系列データ格納用ストレージおよび時系列局所細胞モニタリング 装置の開発 (東大・三宅研)	63
2-11	補遺 (精密解析が必要な理由)	68
第3章 デバイス関連技術開発		69
3-1	デバイス開発の必要性 (がん浸潤転移を例として)	69
3-2	がん浸潤・転移能検出デバイスの開発	74
3-2-1	がん浸潤能検出デバイス (東大・長棟研)	
3-2-2	がん運動性機能検出デバイス (産総研・RICE 臨海)	
3-3	低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発 (東大・鷺津研)	86
3-4	遺伝子発現の同期化技術の開発 (東大・長棟研)	90
第4章 応用研究		93
4-1	創薬の現状および、ハイスループットの限界点	93
4-2	パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索 (癌研究会、協和発酵キリン)	98
4-3	パスウェイ解析を応用した機能性化粧品の開発 (カネボウ化粧品)	112
4-4	一細胞時系列計測に基づく遺伝子探索の実用性の評価 (産総研・RICE つくば)	118
第5章 総合調査研究および集中研の活動 (バイオインダストリー協会)		123
5-1	海外調査報告	123
5-2	委員会等の開催	134
5-3	集中研における共用システムの構築およびその運用実績	135
特許、論文、外部発表等の件数		141

図表			
図 2(2)-1～6	第 2 章	2 - 2	142
図 2(3)-1 A～J	第 2 章	2 - 3	147
図 2(4)-1	第 2 章	2 - 4	152
図 2(5)-1～8	第 2 章	2 - 5	152
図 2(6)-1	第 2 章	2 - 6	157
図 2(7)-1～9、表 2(7)-1	第 2 章	2 - 7	158
図 2(8)-1～6	第 2 章	2 - 8	162
図 2(9)-1～8	第 2 章	2 - 9	165
図 2(10)-1～2	第 2 章	2 - 10	169
図 3(1)-1～2	第 3 章	3 - 1	170
図 3(2)-1～5、5B、6～17	第 3 章	3 - 2	171
図 3(3)-1～6	第 3 章	3 - 3	182
図 3(4)-1～2	第 3 章	3 - 4	184
図 4(2)-1～45	第 4 章	4 - 2	185
図 4(3)-1～12	第 4 章	4 - 3	208
図 4(4)-1～11	第 4 章	4 - 4	214
2.2 リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発			224
2.3 タンパク質導入法ならびに定量リン酸化プロテオーム解析による 細胞モニタリング技術の開発			234
IV. 実用化、事業化の見通しについて			248

(添付資料)

- ・ 特許論文リスト
- ・ 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
- ・ 実施方針（平成17年度～平成21年度）
- ・ 創薬・診断分野の技術戦略マップ
- ・ NEDO POST 3
- ・ NEDO POST 3 に対するパブリックコメント募集の結果について

概要

		最終更新日	2010年7月22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	細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発	プロジェクト番号	P05009
担当推進部／担当者	バイオテクノロジー・医療技術部／上村研一（平成21年1月～現在） バイオテクノロジー・医療技術開発部／残間雅秋 バイオテクノロジー・医療技術開発部／吉田光宏		
O. 事業の概要	本プロジェクトでは、人体の組織や疾病等の様々なモデル細胞株を創製するための技術開発を行うとともに、多数の細胞に同時に異なる遺伝子を高効率で導入することにより、複数の遺伝子発現等の時系列計測を行い、得られる種々の細胞応答データから遺伝子ネットワークを解析する細胞アレイ技術を確立し、疾患関連遺伝子等、特定の創薬ターゲットの同定に有用な汎用性の高い解析ツールを開発する。		
I. 事業の位置付け・必要性について	本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・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。 具体的には、本研究開発は、NEDO プロジェクト（Focus21）によって開発された国産技術であるトランスフェクションアレイ（TFA）技術を応用しつつ、さらに細胞、遺伝子、情報処理などにかかわる諸技術を統合して開発することによって、創薬ターゲット探索の精度・速度を向上させ、創薬プロセスの技術革新を図るものである。社会的にも関心の高い「がん」、特に「乳がん」を重点対象とし、アポトーシス誘導、血管新生阻害、転移・浸潤抑制、増殖抑制、薬剤感受性などの作用をもたらすネットワークや化合物を系統的に解析し、効果的で副作用のない薬剤開発を可能にする手法の確立を目指す。		
II. 研究開発マネジメントについて			
事業の目標	(1) 最終目標（平成21年度末） 細胞応答の時間的な変動解析を通じて有望な創薬ターゲット遺伝子を高効率に絞り込む技術を確立するとともに、当該技術を利用して、創薬ターゲット遺伝		

	子を同定する。 (2) 中間目標（平成 19 年度末） 細胞へ高効率に遺伝子や遺伝子発現レポーター等を導入する技術及び得られる細胞応答データを整理・統合して解析することを可能とするソフトウェア技術の開発に目処をつける。						
事業の計画内容	主な実施事項	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	
	細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発	→	→	→	→	→	
	リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発	→	→	→			
	タンパク質導入法ならびに定量リン酸化プロテオーム解析による細胞モニタリング技術の開発	→	→	→			
	成果とりまとめ			→		→	
開発予算 (単位：百万円) 契約種類：委託	会計・勘定	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	総額
	一般会計	306	431	319	246	249	1,551
	加速予算 (成果普及費を含む)			47			47
	総予算額	306	431	366	246	249	1,598
開発体制	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	東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一					
	サブリーダー	東京大学大学院工学系研究科教授（～H22/3） 大阪大学大学院基礎工学研究科教授（H21/4～） 三宅 淳					
	委託先	H17～21 年度 ・(独)産業技術研究所 ・(財)癌研究会 ・協和発酵キリン(株) ・(株)カネボウ化粧品 ・(財)バイオインダストリー協会 <再委託> 京都大学、山口大学 <共同実施> 東京大学 H17～19 年度 ・アステラス製薬(株) ・エーザイ(株) <共同実施> 岡山大学					

<p>情勢変化への対応</p>	<p>当該プロジェクト発足時には、細胞をめぐるパスイューデータベースやその利用技術の開発は世界のポストゲノム研究の重要な課題として認識される機運にあり、各国で研究が開始されていた。例えば、米国では AfCS 研究所のシグナリングゲートウェイ、MIT のネットワークバイオロジー、NIH の ENCODE、スクリプス研究所のファンクショナルゲノミクスなどのプロジェクトが推進されている。カナダではサイバーセル、フランスでは GPCR プロジェクト、ドイツでは Mitocheck プロジェクトなどである。ゲノム解析に見られた国際競争は、細胞にも持ち込まれ、ハイスループットスクリーニング (HTS) に代表される網羅的な解析手法が有用と考えられた状況であった。単純な現象の解析や繰り返し操作によって解析精度が深まるような容易な対象であれば多数検体に対する HTS は有力であった。</p> <p>しかしながら、数年を経て HTS・網羅的手法の限界も明らかになってきた。想定される分子相関などの論理構造が簡単なものであり (例えば、細胞死あるいは特定機能の活性化など)、解析に用いる判定方法に分岐・相互変化・曖昧性などがない場合には有用である。これに対し、パスイューが複雑に相互関連した構造を有する場合、その解析は単純な HTS 技術の対象になりにくいことが、プロジェクトの進展と共に認識されるようになってきた。生物学的に重要な細胞機能；分化増殖、がん化などが、限られた数の遺伝子やタンパク質で支配されているとは考えられず、それら分子の相関や制御にかかわる論理構造が単純なものとは想定し難い。</p> <p>世界的にも当該時期には、重要な生命現象について、検体数を少なくとも深く解析することが必要なことが、認識されるようになってきた。即ち、ハイコンテントアナリシスという言葉に代表されるような「精密解析」の重要性が増した。この種の方法では、対象となる細胞も平均的に扱うのではなく、精度を高めるために一細胞を対象とすること、細胞の変化や分子間相関関係について、時間的変動を解析することによって分岐や回帰なども包含する多次元構造を把握する方法が求められるに至ったのである。以来この流れは定着しており、Single cell analysis workshop(SCAW)などをはじめとし一細胞解析の方法開発が盛んに行われ、その遺伝子発現や形態の経時的な変化、力学、電気化学的な測定を行う手法の開発が進みつつある。</p> <p>上述のような変遷に対して本プロジェクトでは中期以降は一細胞時系列解析に焦点を当て、その要素技術開発としてパスイュー解析のための時系列解析技術の開発、パスイュー解析の評価方法を確立すること、およびそれを元にパスイューに干渉する標的を調べる方法の確立等に注力し様々な要素技術の開発に成功した。</p> <p>その結果、具体的な要素技術として既存細胞株と臨床分離組織由来の培養細胞を比較し評価する技術を開発し、乳がんに対する抗がん剤の候補遺伝子を見いだした。細胞操作技術として、低侵襲で細胞に物理的かつ確実に遺伝子を導入するデバイス (電界集束型エレクトロポレーション) を開発した。パスイューの評価技術として、経時的に撮像した細胞の微弱蛍光を捕え細胞を識別、数値化し、得</p>
-----------------	---

	<p>られた数値を用いて遺伝子の相互作用の強さおよびその安定性等を評価する技術を開発した。即ちソフトウェア「超微蛍光レポータ遺伝子画像解析システム」・「細胞アレイによる主要パス高精度同定システム」を開発した。細胞を測定するために時系列局所細胞モニタリング装置を製作し、データの運用では 200TB のストレージを含むデータ処理システムを構築し解析を行った。細胞の制御方法として遺伝子を時間的に制御する方法および遺伝子発現の位相を揃える技術を開発した。また、実際の創薬への応用を目指し、よく用いられる抗がん剤（パクリタキセル）を例として、パスウェイ全体の制御による新薬探索のための方法開発を進めた。パスウェイ解析によりテーラーメイド医療を実現するための患者の分類をより精密に行なうことが可能となった。症状の分類のために新規細胞株を樹立した。医薬品以外の分野への応用として、機能性化粧品の開発を行い、本技術の有用性を示した。解析対象を遺伝子発現の時間変化だけでなく、細胞の浸潤転移の測定のために浸潤転移計測セルアレイを開発した。</p>
<p>中間評価結果への対応</p>	<p><主な指摘と対応></p> <ul style="list-style-type: none"> ・総合評価 <p>【指摘】ゲノム創薬の最も困難な点に関して非常に挑戦的な試みを行い、細胞ベースでの時間分解能を持った発現制御・計測技術を確立しようとすることは、今後の創薬研究のトレンドを作るものとして高く評価できる。プロジェクトは、全体的に順調に進行しているものの、国際情勢およびユーザー意見を踏まえて、実用化に向けた課題と出口イメージのさらなる明確化と目標の見直しが望まれる。</p> <p>【対応】プロジェクト後期に開発した要素技術は測定・解析システムを含めて実用化、あるいは実用化レベルに達しており実用化に向けた技術的な問題点は解決されたと判断できる。</p> ・今後に対する提言 <p>【指摘】細胞の「発現」状態を制御する基礎技術は、今後の細胞ベースの研究での基盤となりうることから、さらに細胞ベースでの実時間「機能」解析技術との組み合わせによる「発現&機能」解析を行う研究開発の拡大が望ましい。また、技術要素を抽出して、より簡易な系として創薬現場で使いこなせる技術にまとめることも重要である。</p> <p>【対応】光の照射によって簡易に遺伝子の発現制御が可能となっている。今後の研究によってより簡易な技術として発展していくことが期待される。</p> <p>【指摘】今後、本プロジェクト成果の実用化に向けて、テーマ間のより一層の相互連携が望まれる。</p> <p>【対応】プロジェクト後期に注力した一細胞時系列測定の要素技術開発では実験系（東大）と解析系（CBRC）が強く連携した結果として測定から解析まで一</p>

	<p>括した要素技術開発が行われた。</p> <p>・研究開発マネジメントについて</p> <p>【指摘】創薬の現状に照らして、開発目標、開発計画は、概ね妥当であり、良好な研究開発マネジメントが行われている。一方で、具体的、定量的な開発目標が必ずしも明確でない部分もあり、海外との比較や創薬メーカー等のユーザー意見を踏まえて、目標をさらに明確化し、必要に応じてチーム構成の見直しを検討することが望まれる。</p> <p>【対応】世界情勢がハイスループットからハイコンテンツに主流が移りつつあることと、プロジェクト内の一細胞計測の重要性から注力する分野を一細胞時系列に移し、基本的な要素技術開発がなされたことでマネジメントが成功裏に行われたと判断できる。また、要素技術を用いたパスウェイ解析によってパクリタキセルの感受性を増感させるパスウェイの同定の可能性を示したことにより、プロジェクトの目標である創薬基盤技術の開発がなされたと判断できる。</p> <p>・研究開発成果について</p> <p>【指摘】本技術はアレイ化されており、経時変化も一目瞭然で、薬剤効果の評価系として、良い技術開発である。siRNA の医療応用が期待される中、その貢献は大きいと評価できる。また、研究の業績は、多くの論文にまとめられている。しかし、どのようにすればユーザーが普遍的に使ってくれる技術となるのか、という観点での議論をする必要がある。</p> <p>【対応】プロジェクト後期は一細胞時系列解析に注力することによって、対象となる細胞や実験条件を調整することおよび計測のためのソフトウェアの開発を行うことによってばらつきも含めた評価ができるようになった。今後は更にデータを積み重ねることによって信頼性が増すと考えられる。</p>	
評価に関する事項	中間評価	平成 19 年度 中間評価実施
	事後評価	平成 22 年度 事後評価実施
III. 研究開発成果について	<p>細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発</p> <p>これまでのゲノム創薬においてはハイスループットスクリーニング (HTS) による効率化が検討されてきた。しかし、現在のゲノム創薬の状態をみると、欧米のメガファーマにおいても巨費を投じたにも関わらず、上市された薬剤は未だ少数に留まり、その開発の難しさはさらに増している状況である。HTSを用いた疾患に決定的な遺伝子の同定により新薬を開発することだけでは創薬効率の向上は期待し難い可能性がある。また、単剤の限界を考慮する必要がある。遺伝子は疾病の重要な要因の一つだが、単一遺伝子が原因となる場合以外に遺伝子群および、その時間的な流れ (パスウェイ) 全体が要因となる可能性が示唆されてい</p>	

る。パスウェイを構成する遺伝子、薬剤によるパスウェイの変化の明瞭化がゲノム創薬の基盤確立に極めて重要な要素となる方向性が示されていると思われる。この観測には精緻な計測技術と遺伝子・細胞の制御を必要とする。また、細胞操作として再現性のある物理的・機械的な手法を用い、細胞種によらず細胞状態の再現が重要である。更に細胞状態を変化させる操作（生理活性物質や刺激等）を用いない計測方法が望まれる。パスウェイを重視する方法は創薬の効率的な探索に新たな方法を開くものであり、波及効果として、既存薬の標的パスウェイに対して別の既存薬の併用による薬効の強化にも利用可能と考えられる。

本プロジェクトの研究開発目的は、パスウェイ解析のための時系列解析技術の開発、パスウェイ解析の評価方法を確立することおよびそれを元にパスウェイに干渉する標的を調べる方法を確立することである。当該方法は欧米との競合可能な領域と考えられ、経産省／NEDO プロジェクトとして意味があると考えられる。

本プロジェクトでは上記問題を解決する要素技術の開発により、既存創薬に新たな領域を創出することを試みた。要素技術として既存細胞株と臨床分離組織由来の培養細胞を比較し適切性を評価する技術を開発し、乳がんに対する抗がん剤の候補遺伝子を見いだした。次に細胞操作技術として、低侵襲で細胞に物理的かつ確実に遺伝子を導入するデバイス（電界集束型電ロポレーション）を開発した。パスウェイの評価技術として、経時的に撮像した細胞の微弱蛍光を捕え細胞を識別、数値化し、得られた数値を用いて遺伝子の相互作用の強さおよびその安定性等を評価する技術を開発した。即ちソフトウェア「超微蛍光レポート遺伝子画像解析システム」・「主要パス高精度同定システム」を開発した。細胞を測定するために時系列局所細胞モニタリング装置を製作し、データの運用では200TBのストレージを含むデータ処理システムを構築し解析を行った。細胞の制御方法として遺伝子を時間的に制御する方法および遺伝子発現の位相を揃える技術を開発した。また、実際の創薬への応用を目指し、よく用いられる抗がん剤（パクリタキセル）を例として、パスウェイ全体の制御による新薬探索のための方法開発を進めた。パスウェイ解析によりテーラーメイド医療を実現するための患者の分類をより精密に行なうことが可能となった。症状の分類のために新規細胞株を樹立した。医薬品以外の分野への応用として、機能性化粧品の開発を行い、本技術の有用性を示した。解析対象を遺伝子発現の時間変化だけでなく、細胞の浸潤転移の測定のために浸潤転移計測セルアレイを開発した。

これらの要素技術開発が成功裏に行われたことで、既存の創薬領域とは異なる新たな創薬領域が創出されるものと思われる。今後、継続して汎用化、応用化の研究が続けられることを期待する。

投稿論文	206 件
特許	4 件

	学会発表、講演	280 件
IV. 実用化、事業化の見通しについて	<p>細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発</p> <p>1. 産業技術総合研究所 CBRC</p> <p>1) 「超微蛍光レポータ遺伝子画像解析システム」 微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化ソフトウェア。多重閾値の設定等の微弱蛍光補足アルゴリズムは新規であり、計測機器付属のソフトウェアと組み合わせた販売が可能である。</p> <p>2) 「細胞アレイによる主要パス高精度同定システム」 数値化を含む主要パスの定性的同定を実装したソフトウェア。数理解析に不案内な利用者の利便性を考慮して、KNIMEによって可視化と各解析段階のコンパートメント化を実現した。これにより、利用者は複雑な解析を、可視化された手続きに沿って容易に実行できる。これらのソフトウェアは、コンピュータのOSに依存せず通常のPCに実装可能であり、提供が容易である。また、動態解析ソフトウェアは、採用した既存技術の一つであるDifferential Eliminationが実装されているMapleソフトへの組み込みを計画している。</p> <p>2. 産業技術総合研究所 RICE (臨海)</p> <p>1) がん運動性機能検出デバイス (細胞運動性評価チップ) 実用化を目指し、企業および大学との共同研究を進めている。本技術は、がん転移に関わる創薬ターゲット探索、あるいはリード化合物の評価等への応用が期待できる。</p> <p>3. 産業技術総合研究所 RICE (つくば)</p> <p>1) アシュワガンダを使用した抗がん剤および健康食品 (がん細胞の選択的壊死を誘導する) アシュワガンダ抽出物について企業と共同研究を計画している。</p> <p>2) モータリン染色をリポーターとした抗がん siRNA スクリーニング 基礎研究段階であるが、抗がん遺伝子探索法として有用である。</p> <p>3) (がん細胞の薬剤耐性に関与する) BST2 タンパク質： 基礎研究段階であるが、様々な応用が考えられる。</p> <p>4. 癌研究会、協和発酵キリン</p> <p>1) 次世代の抗がん剤治療予測システム 本研究で検証された手法を用いて、薬効発現機序に関わる遺伝子群を用いた、精度の高い治療効果予測システムの確立が可能となった。また、この診断システムは、同種の機序を有する新薬の臨床開発においては、効果が期待される患者の選択を通して、より効率的な臨床試験の遂行に有用である。</p>	

2) (既存抗がん剤を中心にした他剤併用に関する) がん治療、抗がん剤創製の新アプローチ

がん治療における他剤併用の可能性を、臨床試験することなく予測するシステムを開発し、今後のがん治療、抗がん剤創製に新しいアプローチを提供できると思われる。

5. カネボウ化粧品

1) 機能性化粧品

同定した紫外線感受性遺伝子について、その発現に影響する化粧品素材を探索し、紫外線障害を防御する化粧品の開発を目指す。また、研究過程で得られた種々の遺伝子について化粧品開発への利用を検討する。

6. 東京大学 三宅研

1) 遺伝子発現解析技術 (遺伝子発現の開始に関する評価技術)

汎用技術になると思われる。ただし、知財権は取得しなかった。

2) (本事業において製作した装置・システム)

①時系列局所モニタリング装置: 本事業において数台の生細胞観察装置を使用した結果、改善すべき課題 (画像解像度、時間分解能、装置の頑健性) が明らかになったので、改良装置を製作した。本装置は横河電機より製品化された (商品名: CellVoyager)。

②時系列データ格納用ストレージ (大量の細胞画像保存用): 本体は市販品であるが、容量が大きいので運用に懸念があった。しかし、順調に稼動し、その有用性が確認された。

7. 東京大学 長棟研、鷺津研

1) がん浸潤能検出デバイス (がん細胞の浸潤を指標とした評価チップ)

実用化できる段階にあるが、企業との提携は未定。

2) (オンチップ) エレクトロポレーション技術

実用化できる段階にあるが、企業との提携は未定。

8. 京都大学

1) 「ネットワーク補完」ソフトウェア技術

本研究において開発したネットワーク補完の概念や方法論は、新規性と実用性を備えている。現在、さらなる改良法を開発中であり、有効性が確認できれば、web サーバー等を用いて公開する予定である。その結果として様々なネットワークの解析や推定に有効に活用できる可能性がある。

9. 山口大学

1) 染色体コピー数の解析の過程で見出した遺伝子 A

	治療法に限られる triple-negative 乳がんへの応用が期待される。	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成17年3月 作成
	変更履歴	平成18年2月改訂（最終目標、中間目標の具体化のため改訂） 平成20年7月改訂（イノベーションプログラム基本計画の制定により、「研究開発の目的」の記載を改訂）

用語集

CGH アレイ	Comparative Genomic Hybridization : 全染色体を対象にしてゲノム DNA の過剰、欠失、増幅などのコピー数異常を短時間で検出する方法。またそれをアレイ化してそのスループット性を高めたもの
MAPK	セリン/スレオニンキナーゼの一つであり、様々な細胞機能に対して重要な働きをしている。相互作用のハブとなっている。
TRAIL	TNF related apoptosis induced ligand : TNF (腫瘍壊死因子) ファミリーと似た配列をもち Death Receptor 4, 5 等と結合しアポトーシスを誘導する。正常細胞に対してはアポトーシスを誘導しないことから分子標的薬の可能性を持つ。
Transcription cis-element	制御している遺伝子上流部位に存在する制御配列
がん浸潤	がん細胞が原発組織から移動し、隣接する、あるいは他の組織へ進入すること。がん転移の端緒である
エレクトロポレーション	細胞に電圧を印加することによって細胞膜に微小な穴を開けプラスミド等を細胞に導入する方法
ケージド化合物	光感受性の官能基を修飾した化合物。ここではプラスミドに対して光感受性の官能基を修飾し、嵩高さを与えることによって失活させた状態を作っている。光を照射するとケージド化合物が乖離する。
ゲノムワイド	文献上で記載されている全てのヒト由来遺伝子が本来の意味だが、現実的には、機能的に関連するものの中で入手可能な遺伝子全てを意味する
ゲノム異常	細胞の染色体領域のコピー数の増加・減少による異常を指す
スナップショット	実験中の一時点での測定
セルアレイ	スライドガラス上に細胞を配列させたもの。本プロジェクトでは対象となるプラスミド、siRNA などを配列させ、その上から細胞を播種することによって特定位置の細胞に対して特定のプラスミド、siRNA 等を導入するためのアレイを指す。
ネットワーク	遺伝子およびその産物であるタンパク質間に働く機能等の相関について、包括的に表現したもの（理解のための図示であり、時系列的にも変化するものであることに留意）
パクリタキセル (PTX)	乳がんによく用いられる抗がん剤の一つ。微小管に結合し脱重合阻害することによって細胞増殖を阻害する。
パスウェイ	連鎖的に生じる分子間相互作用や調節作用など（主に細胞内の分子生物学的な機能にかかわることが扱われる）
パスウェイ解析	細胞内の遺伝子等がお互いに作用している状態を解析すること。相互作用する遺伝子を見つけることや、相互にどのような動的挙動を持つかを調べるのが重要となる。

一細胞時系列計測	細胞を個別に認識しその挙動を追跡計測する計測方法。細胞の自動撮像、撮像後の細胞認識等その解析には様々な要素技術を要する。得られるデータは巨大になる。
運動性 (がん、細胞)	細胞が組織内を移動するための機能。細胞は糸状仮足、葉状仮足によって移動する。
固相トランスフェクション	遺伝子導入試薬とプラスミド (あるいは siRNA) の混合物を細胞培養器 (培養皿、ウェルプレート、スライドガラス等) に塗布し、その上から細胞を播種することによって遺伝子を導入する方法
細胞認識	一細胞時系列計測で撮像された画像から目的とする細胞のみを認識すること。画像が経時的に複数枚存在する中から同一の細胞を認識することが重要となる。
紫外線感受性	紫外領域の波長の光による、組織 (皮膚等) や細胞の障害の受け易さを示す。単位面積当たりの熱量 (Jm^{-2}) によって評価する。
時系列データ	多元・多次的現象の解析のために、細胞内分子状態について時間軸に沿って解析して得られたデータの集合。極めて大きなデータ量となる
主要パス統計検定	2つの時系列計測データについて統計的に検定を行い、時系列データのどの時点の計測値が有意に異なるかを判定する手法
数値化アルゴリズム	一細胞時系列計測され、認識された細胞を数値に置き換えること。細胞の領域認識によって等、重要な要素技術を必要とする。
代謝ネットワークの頑健性	対象となるネットワークがどの程度の要素の欠失までもとの機能を維持できるかを示す指標
大規模解析	多数の要素 (分子、遺伝子ライブラリ) を対象とする解析
動態解析	反応モデルから微分方程式を定式化し、反応パラメータの数値解析を行いモデルの挙動を解析する手法
浮遊系細胞	接着依存性が無くなった動物細胞
併用治療、併用薬	薬剤の相加相乗、副作用の軽減等を目的に複数の薬剤を同時に投与すること

I. 事業の位置付け・必要性について

1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性

1.1 NEDO が関与することの意義

近年、従来型の創薬の欠点を克服し、効率的な創薬方法を確立することを目指した「ゲノム創薬」が注目されている。この方法では、疾病の原因となる遺伝子、蛋白質など生体分子を絞り込み、それをターゲットとして薬剤設計を行うため、疾病特異的な効果や、副作用、毒性の少ない創薬、及び分子標的薬の構築が可能と唱われた。

しかし、ターゲットになりうる遺伝子について、SNPsなどを考慮しても、それだけで高い効能、高い安全性を両立した創薬が可能であるかどうか、方法論としても限界があると考えられつつある。実際の創薬パイプラインの効率化には副作用の予測、あるいは低減、そして疾病細胞、正常細胞を精度良く区別できることが重要であるが、依然極めて難しい課題と認識されている。

一方、最近のポストゲノム研究の発展により、遺伝子やその産物であるタンパク質が多数相互連関している状態、換言すれば（遺伝子）ネットワークが細胞内の機能的な相違に本質的な役割を担っていることが理解されつつある。そのため、一個の分子をターゲットにした視点よりも、遺伝子のネットワークを想定した全体的な視点が重要な方法を提供する可能性が高い。特に、ネットワーク上で把握される細胞内情報伝達のパスウェイを如何に制御するかが創薬の重要な知識基盤と考えられる様になってきた。

かかる状況を踏まえ、本研究開発は、多くの遺伝子がかかわる現象を効率よく解析する方法を開発することによって、細胞内の遺伝子の相関を考慮しつつ候補遺伝子の中から最も効果的に薬効を発揮しかつ副作用が少なくなるような創薬ターゲット遺伝子の予測を可能とする、次世代創薬基盤技術の確立を目指すものである。

このような、新しい観点での創薬プロセスを確立するためには、多数の細胞に同時に異なる遺伝子を高効率で導入する技術、複数の遺伝子発現等の時系列計測を行う技術、得られる種々の細胞応答データを解析して疾患関連遺伝子を抽出する技術など、多数の技術の集合からなるスケールの大きな開発が必要である。コア技術であるトランスフェクションアレイ関連技術（がん細胞への siRNA 等導入）、実証に必要な細胞増殖等ハンドリング、細胞モニタリング技術、及びネットワーク・パスウェイ情報解析技術など、生物学、工学、情報など他分野にわたる技術の効果的な融合が求められる。そのためには、研究機関、民間企業の枠を超えた連携を必要とする。

一方、本研究開発で開発する創薬の技術は、従来法ではなしえなかった、①高い効能、高い安全性が両立した医薬品開発、②創薬リスクの低減、開発期間の短縮、費用の削減、入院期間の短縮、薬漬け医療の改善、③これまで治療が困難であった再発がん、転移がん、難治性固形がんの治療を可能にする、④既存薬の薬効メカニズムの解明を可能にする、など国民医療の重要な課題に対して貢献することが期待され、社会的なインパクトがあり、経済的にも波及効果が大きいものである。さらに、本手法の確立は、現状では欧米に遅れをとっている創薬・医薬分野における国際的競争力の回復・向上に資するものである。

上記の通り、当該事業において開発する技術は、創薬の基盤技術のみならず、既存薬を用いた新しい併用療法の開発など医薬医療分野への応用が期待されるなど波及効果も大きい。しかし、現時点においては産業化に向けた基盤的段階であること、また複数の分野を融合するシステムの開発であることを鑑みると、民間企業、特定の研究機関のみでは実施し得ず、NEDO 事業として実施する意義が非

常に高い課題である。

1.2 実施の効果（費用対効果）

日本製薬工業協会加盟の内資系企業 38 社中 27 社のアンケート調査によると、1 新薬を上市するために必要な開発コストは、1990 年代約 350 億円だったものが、2008 年で 484 億円となっている。しかも、開発コストには基礎研究（創薬に必要な基盤技術の開発や複数の候補物質の効果探索など）の費用が含まれておらず、それを加えると 1 新薬当たりの開発コストは 600～680 億円と推計されている。

また、同アンケート調査によると 1 新薬が前臨床から承認までに直接要したコストは 89 億円となっている。医薬品の候補物質が新薬と承認される確率は 1 / 20, 000～22, 000 と言われており、本プロジェクトで開発する創薬の基盤技術により薬効等によるのスクリーニングの精度を高めることになれば、1 新薬当たり数百億円の R & D 費を効率的に運用することに貢献できると考えられる。さらに新薬の開発だけでなく、既存薬の薬効等の見直しにより、有効性が高くしかも安全性も高い新しい薬剤併用療法の開発にもつながると考えられる。

一方、本プロジェクトで開発される、トランスフェクションアレイ技術、BAC アレイ CGH 解析技術、ネットワーク・トラフィック情報解析技術による創薬システムを用い、効率のよい高い効能、高い安全性を両立する確度の高い創薬ターゲット選定や化合物選定が容易になるだけでなく、関連装置、ノウハウ、ソフトウェア（方法論を含む）、データベースが個別、もしくはシステムとして商品となる。また、ターゲット解析に関して委託ビジネスの創出、大規模データの創薬メーカーへの還元なども期待できる。

このように、創薬プロセスの根本的変化が期待でき、これを世界の創薬企業に還元する事業を興すことで、ナショナルプロジェクトとして十分に効果が期待できるものである。

本事業は、平成 17 年度より、表 I.1 に示す予算で実施した。

表 I.1 プロジェクト予算（実績額）

単位：百万円

年度	H17fy	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	合計
一般会計	306	431	366	246	249	1,598
産総研	45	75	62	64	77	322
癌研究会	29	53	36	14	18	150
協和発酵キリン	0	0	0	5	3	8
カネボウ化粧品	8	9	8	9	9	42
JBA	185	211	199	154	143	892
アステラス	20	38	30	—	—	88
エーザイ	20	45	31	—	—	96

2. 事業の背景・目的・位置付け

2.1 事業の背景

製薬産業界では、ライフサイエンス研究における近年の技術的な発展によって蓄積されたゲノムの塩基配列情報や遺伝子発現情報、タンパク質の立体構造情報、タンパク質と低分子化合物の相互作用情報など、様々な情報を活用するゲノム創薬によって創薬プロセスを効率化し、安価な医薬品を迅速に上市することが可能となると期待されていた。

しかし、実際には投入する研究開発費が年々増加していつているにも関わらず、上市される医薬品の数はむしろ減少しており、ゲノム創薬におけるギャップが生じている。これは正常細胞と疾患細胞の遺伝子発現解析結果の比較やプロテオーム解析等の結果から示唆される数百に及ぶ創薬ターゲット候補遺伝子の中から有望な創薬ターゲット遺伝子を効率的に探索・検証し、開発候補の絞り込みを行う技術が未成熟なことが一因と考えられる。

2.2 事業の目的

本研究開発は、多数ある創薬ターゲット候補遺伝子の中から、最も効果的に薬効を発揮し、かつ副作用が少なくなるような創薬ターゲット遺伝子の予測を大規模・効率的に行う技術を目指すものである。即ち、遺伝子発現解析やプロテオーム解析等の結果から示唆される数百に及ぶ創薬ターゲット候補遺伝子の中から有望な創薬ターゲット遺伝子を効率的に探索・検証し、開発候補の絞り込みを行うために必要な基盤技術、及び具体的手法を確立することを目的とする。

新規創薬技術が完成すれば、従来に比べ創薬プロセスのより早い段階で創薬ターゲットをより高い確率で絞り込むことが可能になると期待されるとともに、それによって医薬品の開発効率の向上、医薬品の迅速かつ安価な提供、高齢化社会における国民医療費の高騰化を抑制し、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現に寄与することが期待される。

2.3 事業の位置付け

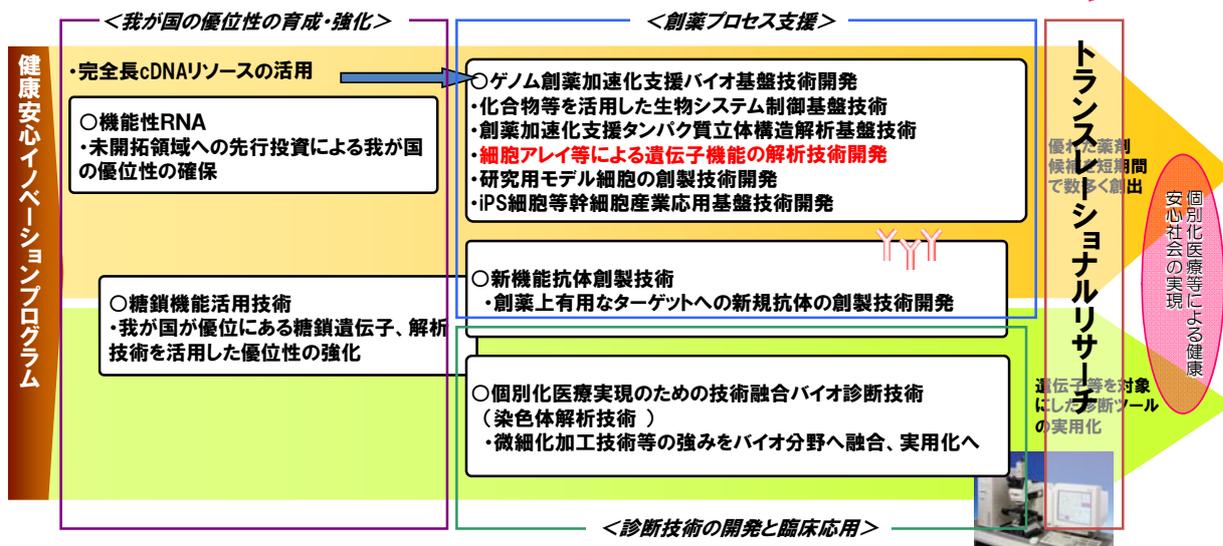
本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーション」プログラムの一環として実施する。

具体的には、本研究開発は、NEDOプロジェクト（Focus21）によって開発された国産技術であるトランスフェクションアレイ（TFA）技術を応用しつつ、さらに細胞、遺伝子、情報処理などにかかわる諸技術を統合して開発することによって、創薬ターゲット探索の精度・速度を向上させ、創薬プロセスの技術革新を図るものである。社会的にも関心の高い「がん」、特に「乳がん」を重点対象とし、アポトーシス誘導、血管新生阻害、転移・浸潤抑制、増殖抑制、薬剤感受性などの作用をもたらすネットワークや化合物を系統的に解析し、効果的で副作用のない薬剤開発を可能にする手法の確立を目指す。

健康安心イノベーションプログラムにおける位置付け

- 創業の技術的ボトルネックを解決し、創業プロセスの高度化・効率化を目指す創業加速化支援技術開発を重点的に推進。コア技術を開発し、創業現場のよりリアルな具体的課題を解決。
- 研究成果の臨床応用を加速するため「臨床研究・臨床への橋渡し促進技術開発」を新たに開始。
- 個別化医療実現に向けた診断ツール開発を重点的に推進。新しい産業の創出を目指す。

創業プロセス： 創業・診断シーズ探索 → 創業ターゲットの絞り込み → 創業候補となる化合物等の探索 → 非臨床 →



II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

1.1 最終目標（平成21年度末）

細胞応答の時間的な変動解析が可能な統合化されたターゲットバリデーションシステムを構築し、ヒト臨床細胞を用いて動的なパスウェイ（シグナル伝達ネットワーク）構造を簡易に抽出できる方式を確立する。本方式を良く研究された既知パスウェイの解析に適用することで解析精度や解析速度の有効性を検証するとともに、実際の創薬ターゲット遺伝子の探索に使い、複数種の創薬ターゲット候補遺伝子の同定に適用することで、創薬支援ツールとしての実用性を証明するとともに、産業上有用な解析ツールとして完成させる。

1.2 中間目標（平成19年度末）

細胞へ高効率に遺伝子や遺伝子発現レポーター、タンパク質等を導入する技術、時系列応答データの取得技術、レポーター遺伝子およびタンパク質リン酸化活性を指標とした細胞応答の定量化測定技術、細胞応答データを整理・統合して解析することを可能とするソフトウェア技術の開発に目処をつける。また、これらの技術のシステム化による創薬ターゲット遺伝子の同定技術を検証するのに用いる疾患モデル細胞株を15種以上樹立する。さらに、細胞応答の時系列変化をより精緻に解析するための細胞応答同調化技術、適用可能な細胞種を拡大するための浮遊細胞対応化技術等の技術開発を行いその有効性を検証する。

2. 事業の計画内容

2.1 研究開発の内容

本プロジェクトの研究開発目的は、パスウェイ解析のための時系列解析技術の開発、パスウェイ解析の評価方法を確立することおよびそれを元にパスウェイに干渉する標的を調べる方法を確立することである。当該方法は欧米との競合可能な領域と考えられ、経産省/NEDOプロジェクトとして意味があると考えられる。

本プロジェクトでは上記問題を解決する要素技術の開発として、時系列技術開発、デバイス・チップ等ハイスループット関連技術開発、またこれらを用いた応用技術開発を研究開発内容として掲げる。時系列技術開発のうち、まず測定および細胞操作のための要素技術として、既存細胞株と臨床分離組織由来の培養細胞を比較し適切性を評価する技術、低侵襲で細胞に物理的かつ確実に遺伝子を導入するデバイス（電界集束型エレクトロポレーション）の開発、細胞の制御方法として遺伝子を時間的に制御する方法および遺伝子発現の位相を揃える技術等の開発を行った。これらの測定および解析のために、細胞を測定するために時系列局所細胞モニタリング装置を製作と200TBのストレージを含むデータ処理システムの構築を行った。これらの技術により、実験系に即した適切な細胞を用いて測定が行えるようになった。また、時系列技術開発のうち解析系として、パスウェイの評価技術として、経時的に撮像した細胞の微弱蛍光を捕え細胞を識別、数値化し、得られた数値を用いて遺伝子の相互作用の強さおよびその安定性等を評価する技術を開発した。即ちソフトウェア「超微蛍光レポーター遺伝子画像解析システム」・「主要パス高精度同定システム」を開発した。

デバイス・チップ等ハイスループット関連技術では、がんの浸潤転移に着目し、細胞の浸潤転移能

を測定するための浸潤転移計測セルアレイを開発し、また細胞の運動に関してがん運動性機能検出デバイスを開発を行った。

応用技術開発としては、よく用いられる抗がん剤（パクリタキセル）を例として、パスウェイ全体の制御による新薬探索のための方法開発を進めた。パスウェイ解析によりテーラーメイド医療を実現するための患者の分類をより精密に行なうことが可能となった。更にパスウェイ解析を行うことによって抗がん剤の併用による効果の増強に関する評価が可能になった。た、実際の創薬への応用を目指し、症状の分類のために新規細胞株を樹立した。医薬品以外の分野への応用として、機能性化粧品の開発を行い、本技術の有用性を示した。

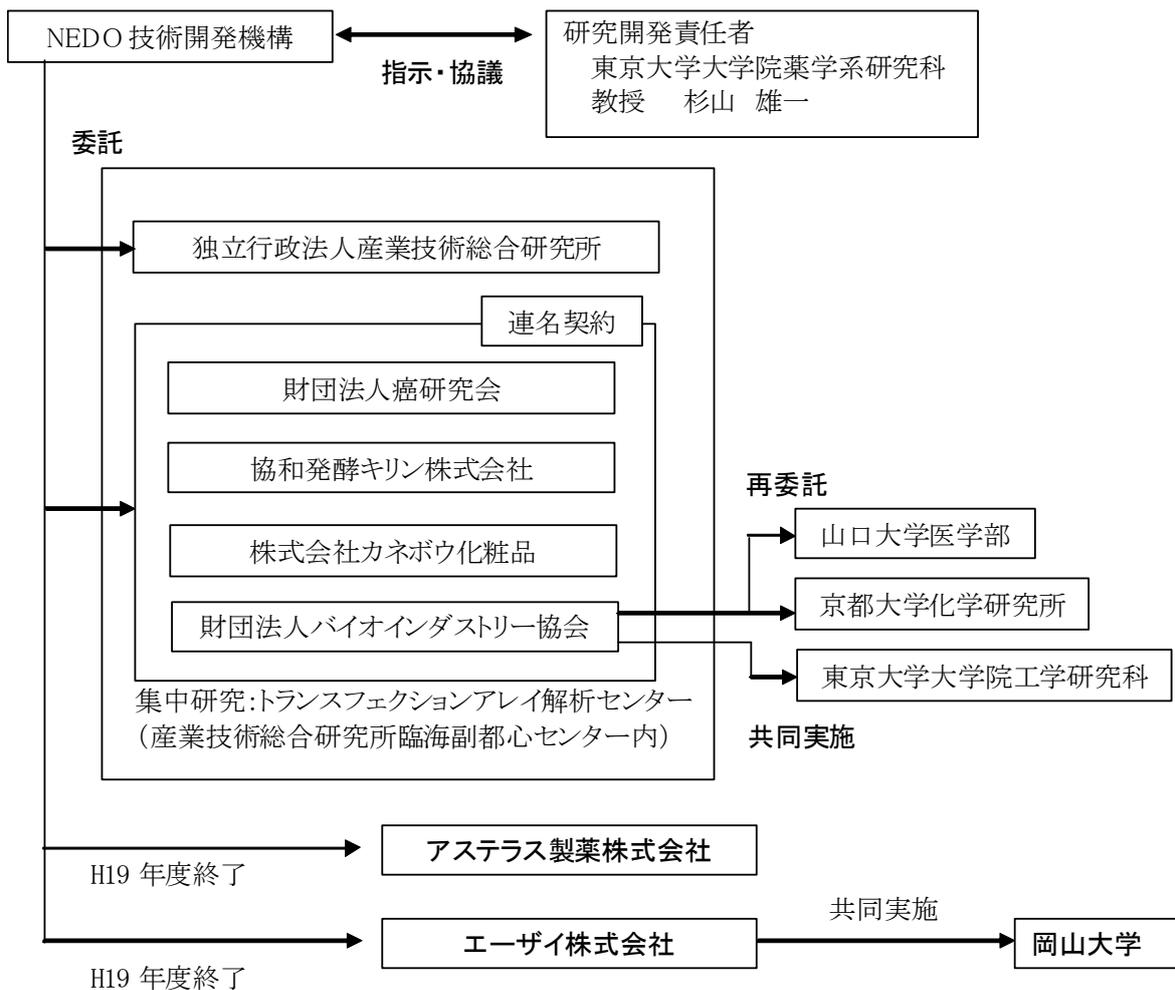
2.2 研究開発の実施体制

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技術開発機構が指名した東京大学大学院薬学系研究科教授 杉山雄一氏を研究開発責任者（以下「プロジェクトリーダー」という。）とし、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

基盤技術の開発、先導研究、初期細胞評価を産業技術総合研究所で実施し、本技術を用いた評価方法の装置、実験環境整備をバイオインダストリー協会が担当し、具体的な応用を癌研究会、協和発酵キリンおよびカネボウ化粧品が行なった。また、産業技術総合研究所と相補的な、細胞への蛋白質、siRNA等の導入技術、及び評価技術を、エーザイ、岡山大学のグループが担当した。さらに、本アレイ技術をベースに、創薬企業として必要な評価技術の開発を、アステラス製薬が担い、がん細胞以外の細胞を用い、具体的なシステムで、本技術の多角的な展開の可能性を検証した。

なお、平成19年度でアステラス製薬、エーザイは当初の目的を達成したことにより終了した。

体制図



2.3 研究開発の運営管理

プロジェクト実施者、外部有識者（非実施者）、NEDO 関係者および経済産業省関係者で構成される研究推進委員会を定期的に（年2回、計9回）開催し、本プロジェクトの進捗と方向性の確認、技術内容の議論、情報交換を行い、効率的な事業の推進を図った。

また、プロジェクト全体の研究内容、進捗および方針について、より具体的に細かく協議するため、プロジェクト推進会議（計13回）および研究推進委員会・小委員会（検討会）（計3回）を開催した。さらに、各実施団体単位および連携したグループ単位で多数の検討会を開催した。

・研究推進委員会の開催

第1回（H17.10.14）、第2回（H18.2.9）、第3回（H18.8.8）、第4回（H19.2.8）
第5回（H19.12.12）、第6回（H20.9.8）、第7回（H21.2.4）、第8回（H21.8.4）
第9回（H22.2.20）

・プロジェクト推進会議の開催

第1回（H17.11.8）、第2回（H17.11.30）、第3回（H17.12.21）、第4回（H18.1.23）
第5回（H18.5.16）、第6回（H18.7.28）、第7回（H18.12.12）、第8回（H19.1.25）
第9回（H19.10.19）、第10回（H20.4.24）、第11回（H20.7.28）、第12回（H21.1.20）
第13回（H21.7.17）

・研究推進委員会 小委員会（検討会）の開催

第1回（H21.9.18）、第2回（H21.12.1）、第3回（H22.2.13）

研究推進委員会委員構成

（委員構成と委員の所属・役職は事業終了時。ただし、アステラス製薬、エーザイおよび岡山大学はH19年度終了時）。

委員長、プロジェクトリーダー

（敬称略）

杉山 雄一	東京大学大学院 薬学系研究科 教授
-------	-------------------

外部委員（実施団体に属さない委員）

末永 智一	東北大学大学院 環境科学研究科 教授
安田 賢二	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所教授
菅野 純夫	東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授
岡本 正宏	九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門 教授
夏目 徹	(独)産業技術総合研究所 バイオメディシナル情報研究センター 細胞システム制御解析チーム 研究チーム長
秋山 泰	東京工業大学大学院 情報理工学研究科 教授

実施団体の委員（H17～H19年度）

富澤 一仁	岡山大学 医歯薬学総合研究科 生体制御科学専攻 准教授
小田 吉哉	エーザイ(株) コア・テクノロジー研究所 主幹研究員
橋本 誠一	アステラス製薬(株) 研究本部分子医学研究所 ゲノム情報研究室 主席研究員
沖津 修	アステラス製薬(株) 研究本部分子医学研究所 主任研究員

実施団体の委員

三宅 淳 (SPL)	東京大学大学院 工学系研究科 教授、大阪大学大学院・基礎工学研究科・機能創成専攻 教授
大串 始	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 部門長
三宅 正人	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 細胞情報工学研究グループ長
藤田 聡史	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 細胞情報工学研究グループ 主任研究員
平野 隆	(独)産業技術総合研究所 産学官連携業務推進部門 産学官連携コーディネータ
ワダワ レヌー	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 細胞増殖制御研究グループ長
カウル スニル	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 細胞増殖制御研究グループ 主任研究員
中村 吉宏	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 招聘研究員
浅井 潔	(独)産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター センター長
堀本 勝久	(独)産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 生体ネットワークチーム長
富永 大介	(独)産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 生体ネットワークチーム 研究員
油谷 幸代	(独)産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 生体ネットワークチーム 研究員
長棟 輝行	東京大学大学院 工学系研究科化学生命工学専攻 教授
鷺津 正夫	東京大学大学院 工学系研究科 教授
徳元 康人	東京大学大学院 工学系研究科 特任講師
袴田 和巳	東京大学大学院 工学系研究科 特任助教
山口 哲志	東京大学大学院 工学系研究科 助教
阿久津 達也	京都大学 化学研究所 バイオインフォマティクスセンター 教授
佐々木 功典	山口大学大学院 医学系研究科 応用分子生命科学系 教授
三木 義男	(財)癌研究会 ゲノムセンター 部門長
長崎 光一	(財)癌研究会 ゲノムセンター ゲノム多様性プロジェクト 発現解析グループ
日下 英昭	協和発酵キリン(株) 研究本部 富士リサーチパーク 安全性研究所長

曾我 史朗	協和発酵キリン(株) 研究本部 富士リサーチパーク 探索研究所 主任研究員
井上 紳太郎	(株)カネボウ化粧品 価値創成研究所 所長
杉山 義宣	(株)カネボウ化粧品 価値創成研究所 皮膚科学研究グループ 主任研究員

事務局：バイオインダストリー協会 市川茂彰、村山仁美

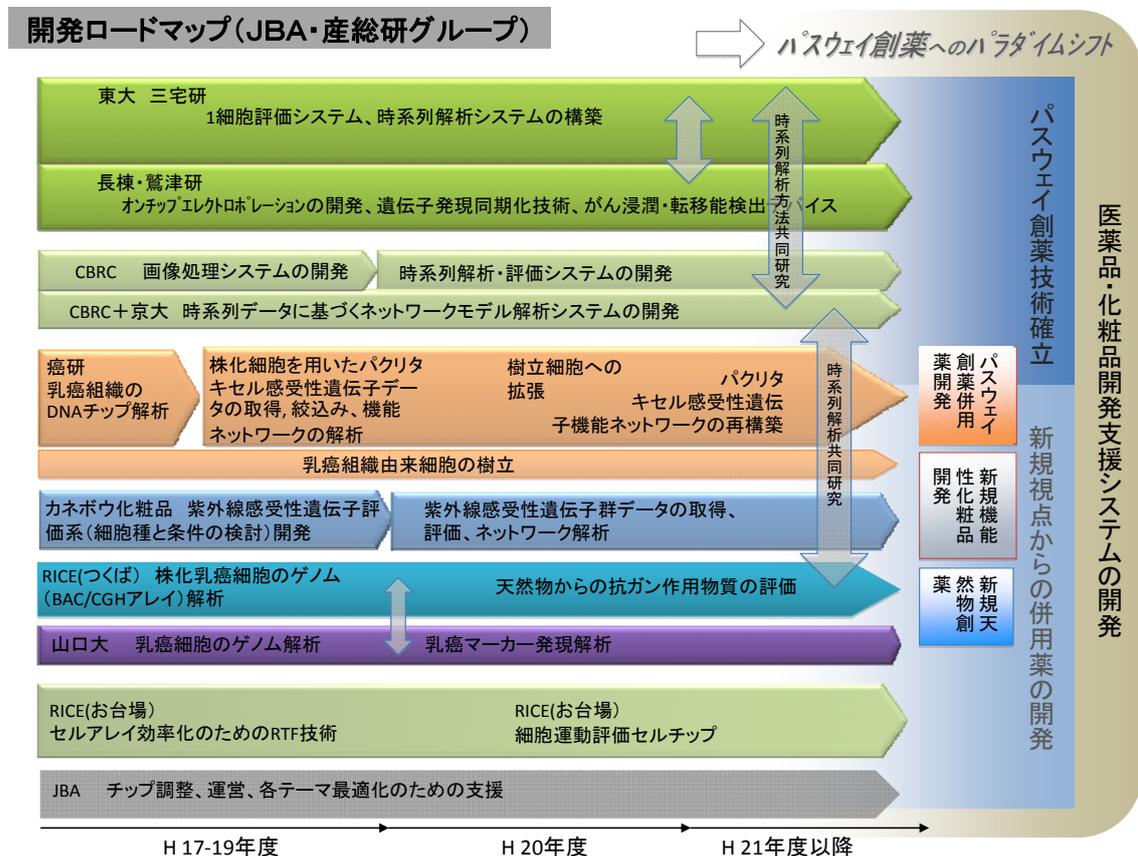
その他運営管理

1) 2007年5月31日(13:30~18:40)、サンケイプラザ(東京)において本プロジェクトに関するワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术ー遺伝子の森から創薬を見るー」を開催した。本ワークショップにおける講演および議論を通して、本プロジェクトの推進に有用な知見および意見を得ることが出来た。また、成果の発表により技術のPRを行うことが出来た。

2) 平成18年9月(大阪)および平成21年12月(横浜)に開催されたバイオジャパン(主催:バイオジャパン組織委員会(バイオインダストリー協会他)、日経BP社)におけるNEDOブースにプロジェクト成果を展示した。

3. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメント

研究開発開始当初より、各実施機関ごとの基礎的な研究から実用化を想定した応用的な研究にいたるロードマップを作成し、それに沿ってマネジメントを行った。



4. 情勢変化への対応

当該プロジェクト発足時には、細胞をめぐるパスウェイデータベースやその利用技術の開発は世界のポストゲノム研究の重要な課題として認識される機運にあり、各国で研究が開始されていた。例えば、米国では AfCS 研究所のシグナリングゲートウェイ、MIT のネットワークバイオロジー、NIH の ENCODE、スクリプス研究所のファンクショナルゲノミクスなどのプロジェクトが推進されている。カナダではサイバーセル、フランスでは GPCR プロジェクト、ドイツでは Mitocheck プロジェクトなどである。ゲノム解析に見られた国際競争は、細胞にも持ち込まれ、ハイスループットスクリーニング (HTS) に代表される網羅的な解析手法が有用と考えられた状況であった。単純な現象の解析や繰り返し操作によって解析精度が深まるような容易な対象であれば多数検体に対する HTS は有力であった。

しかしながら、数年を経て HTS・網羅的手法の限界も明らかになってきた。想定される分子相関などの論理構造が簡単なものであり (例えば、細胞死あるいは特定機能の活性化など)、解析に用いる判定方法に分岐・相互変化・曖昧性などがない場合には有用である。これに対し、パスウェイが複雑に相互関連した構造を有する場合、その解析は単純な HTS 技術の対象になりにくいことが、プロジェクトの進展と共に認識されるようになってきた。生物学的に重要な細胞機能; 分化増殖、がん化などが、限られた数の遺伝子やタンパク質で支配されているとは考えられず、それら分子の相関や制御にかかわる論理構造が単純なものとは想定し難い。

世界的にも当該時期には、重要な生命現象について、検体数を少なくしても深く解析することが必要となったことが、認識されるようになってきた。即ち、ハイコンテンツアナリシスと言う言葉に代表されるような「精密解析」の重要性が増した。この種の方法では、対象となる細胞も平均的に扱うのではなく、精度を高めるために一細胞を対象とすること、細胞の変化や分子間相関関係について、時間的変動を解析することによって分岐や回帰なども包含する多次元構造を把握する方法が求められるに至ったのである。以来この流れは定着しており、Single cell analysis workshop(SCAW)などをはじめとし一細胞解析の方法開発が盛んに行われ、その遺伝子発現や形態の経時的な変化、力学、電気化学的な測定を行う手法の開発が進みつつある。

上述のような変遷に対して本プロジェクトでは中期以降は一細胞時系列解析に焦点を当て、その要素技術開発としてパスウェイ解析のための時系列解析技術の開発、パスウェイ解析の評価方法を確立すること、およびそれを元にパスウェイに干渉する標的を調べる方法の確立等に注力し様々な要素技術の開発に成功した。

その結果、具体的な要素技術として既存細胞株と臨床分離組織由来の培養細胞を比較し評価する技術を開発し、乳がんに対する抗がん剤の候補遺伝子を見いだした。細胞操作技術として、低侵襲で細胞に物理的かつ確実に遺伝子を導入するデバイス(電界集束型エレクトロポレーション)を開発した。パスウェイの評価技術として、経時的に撮像した細胞の微弱蛍光を捕え細胞を識別、数値化し、得られた数値を用いて遺伝子の相互作用の強さおよびその安定性等を評価する技術を開発した。即ちソフトウェア「超微蛍光レポータ遺伝子画像解析システム」・「主要パス高精度同定システム」を開発した。細胞を測定するために時系列局所細胞モニタリング装置を製作し、データの運用では 200TB のストレージを含むデータ処理システムを構築し解析を行った。細胞の制御方法として遺伝子を時間的に制御する方法および遺伝子発現の位相を揃える技術を開発した。また、実際の創薬への応用を目指し、よく用いられる抗がん剤 (パクリタキセル) を例として、パスウェイ全体の制御による新薬探索のため

の方法開発を進めた。パスウェイ解析によりテーラーメイド医療を実現するための患者の分類をより精密に行なうことが可能となった。症状の分類のために新規細胞株を樹立した。医薬品以外の分野への応用として、機能性化粧品の開発を行い、本技術の有用性を示した。解析対象を遺伝子発現の時間変化だけでなく、細胞の浸潤転移の測定のために浸潤転移計測セルアレイを開発した。

5. 中間評価結果への対応

	中間評価結果	対応
総合評価	<ul style="list-style-type: none"> ゲノム創薬の最も困難な点に関して非常に挑戦的な試みを行い、細胞ベースでの時間分解能を持った発現制御・計測技術を確立しようとする事は、今後の創薬研究のトレンドを作るものとして高く評価できる。また、本技術の汎用性を高める努力により、創薬支援技術としての実用化が期待され、我が国の創薬および生命科学研究のレベル向上、国際競争力の向上にも繋がると期待できる。プロジェクトは、全体的に順調に進行しているものの、国際情勢およびユーザー意見を踏まえて、実用化に向けた課題と出口イメージのさらなる明確化と目標の見直しが望まれる。 	<ul style="list-style-type: none"> プロジェクト後期に開発した要素技術は測定・解析システムを含めて実用化、あるいは実用化レベルに達しており実用化に向けた技術的な問題点は解決されたと判断できる。
今後に対する提言	<ul style="list-style-type: none"> 本プロジェクトで成功した細胞の「発現」状態を制御する基礎技術は、今後の細胞ベースの研究での基盤となりうることから、さらに細胞ベースでの実時間「機能」解析技術との組み合わせによる「発現&機能」解析を行う研究開発の拡大が望ましい。また、技術要素を抽出して、より簡易な系として創薬現場で使いこなせる技術にまとめることも重要であり、創薬メーカー等ユーザーサイドの評価を求めて、必要に応じて軌道修正することも必要である。 今後、本プロジェクト成果の実用化に向けて、テーマ間のより一層の相互連携が望まれる。 	<ul style="list-style-type: none"> 光の照射によって簡易に遺伝子の発現制御が可能となっている。今後の研究の継続によってより簡易な技術として発展していくことが期待される。 プロジェクト後期に注力した一細胞時系列測定の要素技術開発では実験系（東大）と解析系（CBRC）が強く連携した結果として測定から解析まで一括した要素技術開発が行われた。
事業の位置付け、必要性について	<ul style="list-style-type: none"> テーラーメイド医療・予防医療・再生医療に重要な知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬および生命科学分野の研究のレベルアップ、国際競争力の向上につなげようという事業であり、「健康安心プログラム」で実施していることは適切である。また、細胞を用いた画期的な創薬ターゲットを探索する技術開発は、民間だけでは取り組むことが難しく、NEDOの事業として妥当である。本プロジェクトの国際競争力について、現状の明示と海外との比較がさらに必要であり、 	<ul style="list-style-type: none"> 世界情勢がハイスループットからハイコンテンツになったが、それに先んじて本プロジェクトでは一細胞時系列解析に注力し、要素技術開発を行った。

	<p>今後の開発の方向性については、世界の現状に照らして軌道修正も検討する必要がある。また、「細胞」の機能理解そのものが大きな知的財産をもたらす可能性もある。</p>	
<p>研究開発マネジメントについて</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・創薬の現状に照らして、開発目標、開発計画は、概ね妥当であり、達成可能な目標設定とスケジュールになっている。戦略的な目標も設定されており、予算、期間の点からも充分評価が出来る点に到達している。創薬に関する高い見識と豊富な情報を有するプロジェクトリーダーを中心として良好な研究開発マネジメントが行われている。一方で、具体的、定量的な開発目標が必ずしも明確でない部分もあり、海外との比較や創薬メーカー等のユーザー意見を踏まえて、目標をさらに明確化し、必要に応じてチーム構成の見直しを検討することが望まれる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・世界情勢がハイスループットからハイコンテンツに主流が移りつつあることと、プロジェクト内の一細胞計測の重要性から注力する分野を一細胞時系列に移し、基本的な要素技術開発がなされたことでマネジメントが成功裏に行われたと判断できる。また、要素技術を用いたパスウェイ解析によってパクリタキセルの感受性を増感させるパスウェイの同定の可能性を示したことにより、プロジェクトの目標である創薬基盤技術の開発がなされたと判断できる。
<p>研究開発成果について</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・中間評価時点では、開発課題の達成は予定通り進んでいる。トランスフェクション効率が向上し、かつアレイ化されているので、経時変化も一目瞭然で、薬剤効果の評価系として、良い技術開発である。siRNAの医療応用が期待される中、その貢献は大きいと評価できる。また、研究の業績は、多くの論文にまとめられ、学会発表と併せて事業の成果は十分に上がっていると評価する。しかしながら、どのようにすればユーザーが普遍的に使ってくれる技術となるのか、という観点での議論をする必要があると考えられる。その際、細胞ベースの計測の信頼性（ばらつきの問題）、細胞機能計測法などについて十分に検討すべきである。 ・また、プロジェクト全体として、特許が少ない印象があり、今後の知財化が望まれる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・プロジェクト後期は一細胞時系列解析に注力することによって、対象となる細胞や実験条件を調整することおよび計測のためのソフトウェアの開発を行うことによってばらつきも含めた評価ができるようになった。今後は更にデータを積み重ねることによって信頼性が増すと考えられる。 ・本プロジェクトは要素技術開発であり、知財化はこの要素技術開発をもとに特許が取得されるものと考えられる。また、成果の中で標的の可能性のある遺伝子は現在のところ伏せられている。大学 TLO の判断で特許化ができないものもあった。

6. 評価に関する事項

平成 19 年 7 月に開催された中間評価において、「事業の位置付け、必要性」「研究開発マネジメント」「研究開発成果」「実用化の見通し」について、それぞれ 2. 5, 2. 5, 2. 5, 2. 3 の評価を得た。

平成 22 年 8 月に事後評価を実施。

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

1.1 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

(産業技術総合研究所、癌研究会、協和発酵キリン、カネボウ化粧品、バイオインダストリー協会、東京大学、京都大学、山口大学)

達成度は、成果が目標に達した場合は○、大きく上まわる場合は◎、未達成の場合は△とした。

目標	研究開発成果	達成度
<p>(I) 時系列解析技術開発</p> <p>特定の疾患に関わる遺伝子と遺伝子群が形成するパスウェイを理解することを目標とする。遺伝子の相関（パスウェイ）は時間的に変化するものであり、そのダイナミズムに多くの情報が含まれる。時間軸上の一点だけをみてもこのような相関を理解することは不可能である。この種の技術はこれまで開発されてこなかったために、新規解析技術の開発が必要である。細胞の取り扱い、装置、情報などの技術を総合的に開発することを目指す。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・時系列測定技術の開発 ・時系列解析技術の開発（微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化アルゴリズム開発、細胞時系列データに基づく主要パス統計検定） ・時系列データを用いたパスウェイ解析（動態解析におけるパラメータ推定精度の向上） ・新規開発法のソフトウェア化 ・パスウェイの理論的解析手法開発 ・遺伝子発現の開始に関する評価技術 	<p>システムのハードウェアとして、東京大学および集中研にて構築運用を行いプロジェクト開始から終了まで大きな故障もなくデータを格納し運用したことによりシステムの実用性が実証できたといえる。また、データ取得装置としての時系列局所細胞モニタリング装置についても作成当初の構想通り機械的な消耗、故障なく、プロジェクト終了時まで運用を行ったことから実用可能であることが実証された。この創薬の基盤システムとして先駆性の高いシステムといえ、製薬企業や化学物質を取り扱う企業への導入が可能である。さらに、このシステムのために導入された大規模情報処理技術は創薬分野のみにとどまらず、広く大規模情報を取り扱う必要性のある領域への波及が期待される。今後は、標準化も視野に入れた取り組みが必要である。また、ターゲットバリデーションシステムのソフトウェアの面では、微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化ソフトウェアとして、「超微蛍光レポーター遺伝子画像解析システム」、また、数値化を含む数理解析を実装したソフトウェアとして、「主要パス高精度同定システム」を作成した。これらのソフトウェアは、コンピュータのOSに依存せず通常のパーソナルコンピュータで容易に実装可能であり、本新規開発技術の配布による提供が容易である。当該ソフトウェアを用いて、MAPK（mitogen-activated protein kinase）パスウェイにおいてタンパク質阻害剤により計測されたデータを解析し、細胞増殖因子（bFGF）の刺激により活性化するパスを同定した。これにより、新規開発法の有効性を示すと共に、本システムにおいて世界で初めて生きた細胞内で相互作用強度の定量的な推定が可能であることを示した。このようにターゲットバリデーションシステムとしてハード面、ソフト面両方を開発、構築しその運用をもって実用性を実証したことで当該プロジェクトの最終目標は十分に達成されたと考える。当該システムが産業上として運用されるとともに継続して汎用化、応用化の研究が続けられることを期待したい。</p> <p>【各実施団体の成果】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 産総研 CBRC <ul style="list-style-type: none"> ・事業項目（H20～21年度）：④遺伝子機能の動的ネットワーク解析システムの開発 ・成果：時系列細胞画像から細胞を認識し、蛍光輝度を数値化するソフトウェア「超微蛍光レポ- 	◎

- ・染色体変化による遺伝子発現の評価
- ・時系列データ格納用ストレージおよび時系列局所細胞モニタリング装置の開発

尚、本目標は前期事業内容の「①細胞モニタリング技術の開発および②細胞情報解析技術の開発」を発展させたものである。

タ遺伝子画像解析システム」、および数値化を含む数理解析ソフトウェア「細胞アレイによる主要パス高精度同定システム」を開発した。これらのソフトウェアにより、遺伝子機能の動的ネットワーク解析システムが完成した。代数算法の利用による新規パラメータ最適化法は、従来の方法に比べ圧倒的精度を示し、またその適用範囲が広いことにより、世界的な注目を集めている。新規法発表からわずか半年の間に、国際会議要旨の専門誌への推薦、専門誌での解説記事依頼があり、また、リール大学（フランス）と韓国科学技術院との共同研究が開始されている。さらに、パラメータ推定は、創薬研究に留まらず多くの分野で重要な技術とみなされている。今後、様々な分野で推定精度の向上に成功した本技術が利用されるものと期待している。従って、目標を上回る成果をあげたと考える。

2. 京都大学

- ・事業項目（H17～21年度）：①離散モデルによるネットワーク解析技術
- ・成果：本プロジェクトでは世界で初めて計算量保障のあるアルゴリズムを開発した。ネットワーク補完は本プロジェクトにより生まれた新たな概念であり、新たな研究分野を開拓できたと考えている。これら一連の研究は国際的に高く評価されており、目標を上回る成果である。

3. 東京大学 三宅研究室

- ・事業項目（H18～21年度）：②細胞の時系列モニタリング技術の開発、③細胞解析システムの拡張
- ・成果②：Transcription cis-element reporter システムを構築し微蛍光であっても細胞の時系列画像を取得することが可能となった。蛍光タンパク質をレポーターとして用いる事によって、一個、一個の生きた細胞からの連続した時系列データを取る事が可能となった。本手法により、細胞生物学の新しい可能性が開かれるものと期待される。
- ・成果③：19種類のプロモータについて、d2EGFP, d1Venus の2種類の蛍光タンパクをつなげたプラスミドを合計38種類作成し、これらのプラスミドを安定的に発現する25株の細胞を作成した。遺伝子の発現タイミングの共通性を調べることによって細胞内の動的挙動を揃える可能性を示した。これにより目標は達成できた。

4. 山口大学

- ・事業項目（H20～21年度）：③臨床モデル細胞の評価指標の開発と提供
- ・成果：株化細胞と（手術で採取したがん組織由来の）臨床モデル細胞の aCGH 結果には大きな差異があることを明らかにした。また、そのデータから、乳がん(triple negative)に特異的に働く遺伝子を同定した。これらは目標を上回る成果である。

<p>(2) デバイス関連技術開発</p> <p>腫瘍の緩解とがんの改善はかならずしも強く相関せず、腫瘍診断時は転移開始状態にあることが指摘されている。局所的な腫瘍ではなく、転移が死因の多くを占めるものの、その機作は解明されていない。この種の機構の解析に有用な新規デバイスの開発が必要である。</p> <p>また、パスウェイの開発に重要である細胞内の遺伝子の発現時期を制御する技術、任意の細胞を取り扱うための固定化技術・物理的な遺伝子導入技術など、新規な手法を用いた細胞の操作技術を開発する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・がん浸潤・転移能検出デバイスの開発 <ul style="list-style-type: none"> a. がん浸潤能検出デバイス b. がん運動性機能検出デバイス ・低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発 ・遺伝子発現の同期化技術の開発 <p>尚、本目標は前期事業内容の「①細胞モニタリング技術の開発および③創薬ターゲット同定技術開発」を発展させたものである。</p>	<p>がんの浸潤・転移問題を明らかにするためにがんの浸潤転移計測デバイスおよび、細胞運動性デバイスを開発した。これにより、これまで創薬ターゲットとして調べることの難しかったがんの浸潤転移問題に関しても標的を調べることが可能となった。また、電界集中型エレクトロポレーションを開発したことにより、通常の接着性細胞だけでなく、浮遊性細胞さらには通常は遺伝子を導入しにくいような初代培養細胞への適用が可能となった。また、光ケージド化合物をプラスミドに修飾することによって遺伝子発現の時間的な制御が可能となった。これらの要素技術の開発により、経時的にがんの浸潤転移を計測できることになった。この要素技術の継続した汎用化、応用化の研究が続けられることを期待したい。</p> <p>【各実施団体の成果】</p> <p>5. 東京大学 長棟研究室、鷺津研究室</p> <ul style="list-style-type: none"> ・事業項目 (H17～21 年度) : ②遺伝子発現の同期化技術の開発、③ターゲットバリデーションシステムの浮遊系細胞への適用拡大 ・成果 : オンチップエレクトロポレーション法により、浮遊系細胞や弱接着依存性細胞にも遺伝子導入が可能となり、目標は達成された。また、細胞膜修飾剤 (BAM) を応用したがん浸潤性検出デバイスの開発を行ったことは大きな成果であると考ええる。更に光感受性の化学修飾によって遺伝子の発現を時間的に制御する技術を開発したことは大きな成果であるといえる。 <p>6. 産総研 RICE(臨海)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・事業項目 (H20～21 年度) : ④TFA サイクル法を基礎とした時系列解析法への拡張、⑤一細胞時系列解析による標的遺伝子絞込みの検証 ・成果 : 細胞運動性評価チップを開発した。また、このチップを用いて、解析を行い (738 種の遺伝子から) 細胞運動制御に関わる遺伝子 48 個を選択できた。さらに、マニュアルトラッキングとリアルタイム PCR 等を用いて、8 遺伝子に絞り込むことが出来た。このことは、一細胞時系列解析がこのような目的の標的遺伝子絞込みに応用できることを意味している。従って、目標は達成された。 	○
<p>(3) 応用研究</p> <p>遺伝子パスウェイを基礎としたゲノム創薬技術は、ハイスループット遺伝子探索では見い</p>	<p>上記時系列解析技術をもとに開発されたパスウェイ解析等をもとに標的を絞り込むシステムを構築した。また、単純な標的絞り込みだけではなく、標的が通過するパスウェイそのものの評価や複数薬剤の併用による相乗的な効果を評価できることは非常に有意義であり、この手法をもとにして既存薬剤の再評価等が引き続き行われることを期待した。また、プロジェクトにおける要素技術を製薬業</p>	◎

だせなかった新規有効な抗がん剤の探索方法の確立に繋がると期待される。すでに確立されている有用な抗がん剤の機作に関わる遺伝子パスウェイを解析し、併用薬として効果を高める方法、すなわち、奏効率を向上させる方法の開発を目指す。このために、がん患者のタイプ分け方法の確立技術を進め、関連する遺伝子の抽出と機作の解明を図る。また、かかる遺伝子パスウェイ解析を皮膚がんの予防に繋がる機能性化粧品の開発に応用する方法を目指す。

- ・パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索
- ・パスウェイ解析を応用した機能性化粧品の開発
- ・一細胞時系列計測に基づく遺伝子探索の実用性の評価

尚、本目標は前期事業内容の「③創薬ターゲット同定技術開発」を発展させたものである。

界だけではなく、化粧品産業にも応用し、紫外線感受性に影響のある候補遺伝子を見つけられたことは非常に意義深い。これらの応用例は要素技術の実効性を証明するものであり、引き続き応用研究が続けられることを期待したい。

【各実施団体の成果】

7. 癌研究会、協和発酵キリン

- ・事業項目（H20～21年度）

癌研究会：⑤パクリタキセル感受性遺伝子候補のバリデーション、⑥パクリタキセル感受性標的の同定

協和発酵キリン：③創薬標的特性の評価、④抗ガン剤の創薬システムの検証

- ・成果⑤⑥：パクリタキセル（PTX）治療結果と（患者由来の乳がん細胞の）23000 遺伝子の発現データから、治療有効群と無効群間で発現差の大きい 106 遺伝子をパクリタキセル感受性遺伝子として選択し、さらにセルアレイおよびパスウェイ解析を用いて 48 遺伝子に絞った。次に、siRNA を用いて PTX 添加後の生死判別を行い、8 遺伝子を同定した。この 8 遺伝子は全て、siRNA 抑制により細胞死を促進することが認められた。また、先に樹立した乳がん細胞株について上記遺伝子をノックアウトしたところ細胞死が促進された。このことはプロジェクトによって開発されたパスウェイ解析手法に遺伝子の抽出が可能であることを示している。従って、目標は達成された。
- ・成果③④：上記において開発された要素技術によってパスウェイ解析を行い、パスウェイに作用する候補遺伝子を見つけた。それぞれの候補遺伝子単独で乳がん細胞に対する抗細胞活性は認められないが、パクリタキセルとの併用時のパクリタキセル感受性の増強作用が確認された。さらに、複数のパスウェイの組み合わせ阻害による効果増強を検討した結果、2 つのパスウェイの組み合わせによりパクリタキセル感受性増強作用がさらに強くなる可能性が示された。このことはプロジェクトによって開発されたパスウェイ解析手法に薬剤の併用効果を評価が可能であることを示している。従って、目標は達成されたと考える。

8. カネボウ化粧品

- ・事業項目（H20～21年度）：③紫外線感受性候補遺伝子の探索システムの拡張、④化粧品業界における化粧品、医薬部外品の成分開発への応用、⑤紫外線応答パスウェイからの紫外線感受性遺伝子の絞込み
- ・成果③④：得られた 22 遺伝子の紫外線感受性への関与を検証するため、細胞生死を判別するコロニー形成試験法と RNA 干渉法を組み合わせた独自の評価を行った。結果、3 遺伝子（KB1, 2, 3）をノックダウンした場合に紫外線照射後の細胞死が誘導されること、また KB2 は DNA 損

	<p>傷の修復を担うヌクレオチド除去修復機構の中の TCR 経路に強く影響することが分かり、化粧品開発の標的となると評価された。このことはプロジェクトによって開発された手法によって化粧品の標的となる遺伝子を発見し、評価することが可能であることを示している。これにより目標は十分に達成された。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 成果⑤：上記 22 遺伝子に、紫外線照射に応答する皮膚細胞内のプロセス（DNA 修復、細胞周期、アポトーシスなど）に関わる遺伝子を加えた 352 遺伝子について絞り込みを行った。結果、新たに紫外線感受性候補遺伝子として 42 遺伝子が見出された。さらに、コロニー形成試験法により、目的の（発現抑制により紫外線感受性が高まる）遺伝子の存在を確かめた。これらには既知の遺伝子と共に、紫外線との関係が未報告の遺伝子も含まれており、新規紫外線応答パスウェイ解明の糸口が得られた。また、本探索システムが機能していることが示された。従って、各目標は達成された。 <p>9. 産総研 RICE(つくば)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 事業項目（H20～21 年度）：③ガン細胞不死化レポーターを指標としたガン抑制標的遺伝子の探索 • 成果：モータリンを指標としたがん不死化レポータを指標としてパスウェイ解析を行うことにより 9 種の遺伝子を同定した。更に細胞を用いて p16 経路の活性および aCGH を調べた結果から、DNA 損傷シグナリングパスウェイに関わる 3 遺伝子に絞り込むことができた。このパスウェイ解析により遺伝子を絞り込む方法の実効性を証明できたため、目標は達成できたと考える。 	
(その他)	<p>10. バイオインダストリー協会</p> <ul style="list-style-type: none"> • 事業項目（H17～21 年度）：①総合調査研究、②ターゲットバリデーションシステム（装置）の構築と運営、③システムの大規模化、拡張 • 成果①：時系列測定に係るニーズと動向を把握し、プロジェクトの方向性を議論するため、H20 年度は 2 件、H21 年度は 1 件の海外調査を行った。 • 成果②③：集中研において、セルアレイの調製と提供、関連機器の供用およびデータ取得と提供を円滑に行うことができた。 	

1.2 リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発（アステラス製薬）

目標	研究開発成果	達成度
<p>(1) 機能保持細胞系の確立</p> <p>糖尿病治療薬の薬効を生物活性変化として定量的に評価可能なモデル細胞系を選定し、薬剤や遺伝子の機能を該生物活性変化を指標として検出可能とする評価系を構築する。</p>	<p>糖尿病治療薬であるメトフォルミンは、肝細胞に作用して糖新生酵素を抑制し、糖産生能を低下させることで血糖低下作用を示すことが知られている。我々は、ラット肝由来の株化細胞 H4 II EC3 を用いることで、メトフォルミン刺激による糖新生酵素の発現抑制及び糖産生能の低下を定量的に検出可能とする評価系を構築することに成功した。</p>	○
<p>(2) 機能保持細胞への高い効率での遺伝子と siRNA の導入技術の開発</p> <p>選択したモデル細胞に対する高い効率（70%以上）での遺伝子や siRNA の導入を可能とする。</p>	<p>H4 II EC3 細胞系に対して、従来法による蛍光タンパク遺伝子（GFP）の遺伝子導入では数%の導入効率であったが、検討して 70%以上の効率で導入と発現を可能とした。次に蛍光タンパク遺伝子導入の成果を踏まえて siRNA の導入についても詳細に検討し、90%以上の細胞での導入を可能とした。これは蛍光タンパク遺伝子（GFP）と FITC 標識オリゴ核酸を用いたフローサイトメトリーにより細かい技術の改良を重ねたことで可能となった。さらに、本技術開発において新たな導入試薬（KG6+エンドポーター）の開発にも成功した。この新規な導入試薬の細胞毒性は、H4 II EC3 細胞系のみならずラットを用いた in vivo での毒性試験においても見出せず、本試薬は in vivo での siRNA キャリヤーとしても期待される。</p>	○
<p>(3) 導入された siRNA の機能検証技術の開発</p> <p>導入した遺伝子もしくは siRNA の機能を生物活性変化や mRNA 及び蛋白質発現量の変化などを指標として評価可能とする（カルチャープレート型細胞アレイ技術）。さらに、多数のリン酸化基質ペプチドからなるペプチドアレイを用いてリン酸化マーカーを探索し、該マーカーのリン酸化活性変化を指標として導入遺伝子もしくは siRNA の機能を評価・検証可能とする技術（リン酸化アレイシステム）を開発する。</p>	<p>H4 II EC3 細胞系を用いて高効率な siRNA 導入技術が確立できたことから、糖新生の律速酵素である PEPCK さらにはハウスキーピングジーンの一つである GAPDH の siRNA を導入して、当該遺伝子の mRNA 及びタンパク質の発現抑制、即ち、遺伝子ノックダウン現象を確認した。また、作用機序が不明な糖尿病治療薬であるメトフォルミンの薬効発現に関与するタンパク質の機能検証実験を行い、カチオントランスポーターのひとつである OCT1 遺伝子の発現を siRNA によりノックダウンすることでメトフォルミン薬効が解除されることが確認された。このことは、細胞機能（グルコース産生能変化、メトフォルミン応答能）を指標とした siRNA の機能検証を可能ならしめたことを意味しており、本細胞系での siRNA の機能検証を可能とする技術が完成した。</p> <p>一方、メトフォルミン刺激の有無によるリン酸化活性変化をリン酸化酵素の基質の集合体であるペプチドアレイを用いてプロファイリングした結果、メトフォルミン刺激に反応してリン酸化レベルが変化するリン酸化マーカー（ペプチド性リン酸化基質プローブ）を見出した。詳細解析の結果、このリン酸化マーカーのリン酸化シグナルの変化は、メトフォルミン刺激によ</p>	○

	<p>る AMP キナーゼ (AMPK) の活性変化に起因して観測されたものと推察された。以上のことは、siRNA ノックダウンが、機能検証に極めて有用であることを示すものであり、当初の目標は成功裏に達成できた。</p>	
<p>(4) 開発技術の妥当性検証のための技術の開発</p> <p>開発技術の妥当性は、細胞機能に関わることが知られている遺伝子或いは siRNA の導入による該細胞機能の変化を的確に検出可能であること、さらには siRNA ライブラリーを用いた loss-of-function 解析を行うことで新規の該細胞機能制御遺伝子の探索が可能とすることにより検証する。</p>	<p>開発技術の妥当性を検証するために、さらに、開発技術を siRNA スクリーニングに応用展開するために siRNA ライブラリー (キナーゼ、ホスファターゼおよび GPCR 遺伝子の配列情報に基づく約 5400 siRNA) を用いたスクリーニングを実施した。スクリーニング結果の解析とヒット判定及び妥当性検証を行った結果、ヒットとして Fbp1、PKA 及び遺伝子 X の siRNA 配列を得た。Fbp1 は、糖新生酵素のひとつであり、PKA は、糖新生を促す生体ホルモン(グルカゴン)の細胞内シグナルカスケード上の公知の分子である。このように Fbp1 や PKA がヒットとして得られたことは、本スクリーニングの妥当性を保証するものであり、当初の目標は達成された。</p> <p>一方、遺伝子 X は、これまでの糖新生・解糖等の糖代謝研究においては報告のない新規な分子であり、創薬標的としての妥当性検証は、NEDO 委託研究「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」において実施する。</p>	○
<p>(5) 開発技術を一般化するための技術の開発</p> <p>開発技術の一般化は、開発技術をアッセイ指標や細胞種を代えても機能評価が可能な系に応用することで達成される。</p>	<p>新規な導入試薬 (KG6+エンドポーター) を用いた高効率な siRNA 導入が細胞種を代えても可能であるかについて検討し、本導入試薬を用いることで H4 II EC3 細胞株 (ラット肝臓由来)、3T3-L1 細胞株 (マウス脂肪由来) および MC3T3-E1 細胞株 (マウス頭蓋骨由来) のいずれにおいても 90%以上の高い導入効率と、且つ、均一な導入プロファイルを示すことを確認した。また、これらマウス由来の細胞株を用いて細胞分化のマーカーを指標とする評価系を構築することに成功している。開発技術の一般化を目的とする siRNA ライブラリースクリーニングは、NEDO 委託研究「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発/siRNA ライブラリー等を用いた生物機能制御遺伝子の探索及び創薬標的検証技術の開発」において「siRNA ライブラリーを用いた脂肪細胞分化制御遺伝子や骨芽細胞分化制御遺伝子の探索」として実施する予定であり、当初の目標は、基本的に全て達成することが出来た。</p>	○

1.3 タンパク質導入法ならびに定量リン酸化プロテオーム解析による細胞モニタリング技術の開発 (エーザイ、岡山大学)

目標	研究開発成果	達成度
(1) 膜透過性 PNA を利用した遺伝子導入法による細胞アレイ上細胞への遺伝子ならびに siRNA 導入法の開発	この研究テーマの目的は、膜透過性 PNA を利用した細胞アレイ上細胞への遺伝子・siRNA 導入法の開発である。我々は、本研究により膜透過性 PNA を利用した遺伝子・siRNA 導入技術の開発に成功した。また、膜透過性 PNA を利用した siRNA 導入の場合、導入する siRNA にマッチする PNA を作製する必要がある。このことはコスト面において費用がかかるため産業化を考えた場合、波及効果が乏しいことが予測された。そこで、すべての siRNA に普遍的に利用できる siRNA 導入法の開発を行い、成功することができた(蛋白質導入法を利用した siRNA 導入技術開発)。本技術は、これまで siRNA の導入が困難であった初代培養細胞にも応用でき、基礎医薬品開発研究、創薬研究に幅広く応用でき、産業への波及効果が大きいと考えられた。	○
(2) 細胞アレイ上細胞へ蛋白質を直接導入し機能させる技術の開発	この研究テーマの目的は、細胞アレイによる遺伝子機能等の解析において基盤技術として重要となる細胞内に高効率に蛋白質を導入する技術の開発である。我々は、本研究によりポリアルギニンによる蛋白質導入法が、幹細胞、前立腺由来細胞以外のすべての細胞に有効であることを示すことができた。また、幹細胞、前立腺由来細胞に対する導入効率が悪い原因も明らかにすることができた。さらに、幹細胞、前立腺由来細胞を含むすべての細胞種に対して蛋白質導入が有効な新しい蛋白質導入技術(ピレンブチレートを用いた蛋白質導入技術)の開発に成功した。以上のように、本開発研究は目的を十分達成することができた。本開発技術は、トランスフェクションアレイ(TFA)技術を用いた時系列細胞モニタリング技術に応用することにより、創薬開発に幅広く応用でき、その産業波及効果は大きいと考えられる。	○
(3) 培養細胞内のリン酸化蛋白質を網羅的・経時的かつ定量的に解析する質量分析法(定量的リン酸化プロテオーム解析法)の開発	我々は本研究により、次に示すように世界トップレベルのリン酸化情報を得ることができた。 マウス脳：2907 ヶ所のリン酸化部位 Neuro2a 細胞：1708 ヶ所のリン酸化部位 BAFc 細胞：693 ヶ所のリン酸化部位 HCT116 細胞：321 ヶ所のリン酸化部位 PC9 細胞：370 ヶ所のリン酸化部位 HepG2 細胞：210 ヶ所のリン酸化部位 DU145 細胞：224 ヶ所のリン酸化部位 MCF7 細胞：186 ヶ所のリン酸化部位	○

	<p>マウスリンパ球：354ヶ所のリン酸化部位 マウス精巣：135ヶ所のリン酸化部位</p> <p>この情報を元に、研究目的や仮説などに応じてリン酸化抗体を作製したり、下記④に示すように内部標準を用意して質量分析にて定量したりすることができる。このように当初の部分提案目的を達成することができた。</p>	
<p>(4) 細胞アレイ上細胞に導入された遺伝子の強発現・ノックダウンを確認するための定量プロテオーム解析技術の開発</p>	<p>我々は本研究により、精度良く、直線性の十分に確保した定量法を確立することができた。実際に156種類のタンパク質の絶対量を求めただけでなく、内部標準用ペプチドとして655種類を合成（うち398種類は精製済み）してあるため、目的とする研究に必要なタンパク質がこれらリストに含まれる場合は、比較的早く対応が可能な状態になっている。</p> <p>さらに5種類の異なる臓器由来のヒト培養がん細胞についてもカタログ化を行った。ここには約1万種類のタンパク質の発現情報と、実際に質量分析で検出できたペプチド情報もあるため、種々の研究においてタンパク質の絶対定量を行う際に必要な情報源となる。このように当初の部分提案目的を十分に達成することができた。</p>	<p>○</p>

2. 研究開発項目毎の成果

2.1 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

第1章 成果の概要

1-1 時系列解析技術開発

1-1-1 時系列測定技術の必要性

遺伝子発現は細胞内の現象を司ると考えられ、細胞内の現象を明らかにするために現在はある特定の時間の発現量を測定することが主流である。ところが遺伝子をはじめとする細胞内の様々な分子はお互いに相互作用するため、その量は経時的に変化する。すなわち細胞内の現象を司るのはこの量的な変化であることが考えられ、これはある特定の時間の遺伝子発現量を測定するだけでは明らかにすることは難しい。すなわち、その発現量の経時的な変化を測定し評価することによりパスウェイにかかわる状態の変化を推定することが細胞内の現象を把握する上で非常に重要であると考えられる。しかしながら細胞に対して遺伝子導入や刺激への応答による遺伝子発現はいつ始まるのか、またどのように変化していくのかを正確に測定する方法は確立されていない。また、細胞内の遺伝子発現は細胞の状態、染色体内の変異による遺伝子数の違いによって著しく異なることが明らかとなっており測定された発現量を単純な平均を用いるのみではその現象を正確に把握することは極めて困難であると考えられる。よって細胞内の現象を正確に把握するためには、個々の細胞を正確に認識し、その発現量を正確に測定し数値化することは細胞内の現象の把握するために非常に重要な問題である。また、測定された遺伝子の経時変化の動態解析をするためにはその背後にある支配方程式のパラメータを適切に推定することが必須である。そのため、細胞内の現象を理解するためには、正確な細胞認識による、遺伝子発現の経時的な観測および数値化、計測データの背後にある支配方程式の適切な比較を行うための開発が重要であるといえる。

1-1-2 時系列測定・解析技術の開発

パスウェイ解析にあたって重要であることは対象となる遺伝子に関して経時的に測定が可能でありかつ数値化が可能であることである。現在細胞のライブセルイメージングが非常に重要な分野になっているにも関わらずその解析には ImageJ (画像解析ソフト、<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) あるいは計測機器付属のソフトを利用するに留まっている。また、細胞毎の蛍光強度はお互いに著しく異なるため、単純な平均化によって代表することが非常に困難である。更に、細胞の中には通常の制御状態を逸脱して非常に強い蛍光強度をもつ細胞も存在する。これらのことから、パスウェイ解析のための時系列変化の測定には多量の細胞を同時に認識することのみならず、それらの中から制御を逸脱したと考えられる細胞を排除すると共に、非常に微弱な蛍光を持つ細胞を認識し数値化することが重要となる。

当初蛍光顕微鏡から取得される大量の細胞画像データから、細胞の形状・特徴等を自動的に数値化することができる画像解析システムを開発した。しかし、細胞種やレポーター遺伝子等の実験条件を変更したときに取得される画像データは、これまでの限られた実験条件下で取得された画像データとは大きく異なるため、この画像処理システムでは、細胞抽出の精度に課題が生じた。そのために画像処理システムを改良し、あらゆる実験条件下で取得された画像データから細胞輪郭を精度良く抽出できるように改良・高精度化を図ると共に、画像解析システムが出力する個々の細胞の計測結果と 1 細胞トラッキング結果を用いて時系列代表値を出力する機能を追加し、さらに、1 細胞トラッキング処理方法を見直し、画像処理システム全体の出力結果の精度向上を図るための開発を行った。

1-1-3 時系列データを用いたパスウェイ解析

システム生物学の重要な課題の一つに、生体分子ネットワーク動態解析がある。一般的な生体ネットワーク動態解析では、まず実験解析結果などの生物学的知見に基づき、分子反応モデルを構築する。次に、分子反応の様式に基づいて微分方程式を定式化する。そして最後に、実験計測データに基づいて反応パラメータの数値解析を実行する。大まかな手続きを書きさえすれば以上のように単純化されてしまうが、各段階で生体分子解析特有の様々な問題がある。まず、細胞内の分子間の関係性は、細胞の置かれた環境によって著しく変化することが知られる。これは、生体分子ネットワークモデルの構築が極めて困難なことを意味する。通常数理解析では、モデルにおいて、関係性の強弱はパラメータ値の大小で表現されるが、関係性の有無は議論されない。ここでは、関係性の有無、ネットワークモデルの構造の変化については、システム生物学のもう一つの重要な課題であるネットワーク構造推定の分野に属するので言及しない。もう一つの困難な問題は、実験計測データに関するものである。よく指摘される問題は、実験計測において十分な時系列データが得られない場合が多いことである。生体の長時間計測において同一条件を維持することが困難であるという本質的な問題があり、また、生物科学における実験が比較的高価であるという実際的な費用の問題もある。この場合、少数の計測点から動態を解析する手法が要求される。さらに、ネットワークを構成する分子すべてについて計測は必ずしも可能ではない。周知のように、細胞内には多様な分子が存在しそれらの状態をすべて計測できる技術の開発は困難である。また、特にヒトでは倫理的な観点から計測すべきでない細胞及び分子もある。この場合は、非計測の分子を含むネットワークの動態を解析する手法が要求される。

我々は、この問題を克服するための試みとして、代数的アプローチを導入した。微分方程式モデルから、代数手法の一つである、**Differential Elimination** によって反応パラメータ間の束縛条件を導出し、この束縛条件をパラメータの数値最適化における評価関数の一部に採用した。この評価関数を実数値遺伝的アルゴリズムに適用し解析を行ったところ、束縛条件を考慮しない場合はパラメータすべてについて正しく推定できなかったが、考慮した場合はすべて推定できた。

さらにこの手法を用いて、**MAPK (mitogen-activated protein kinase)** パスウェイにおいてタンパク質阻害剤により計測されたデータにより、細胞増殖因子 (**bFGF**) の刺激により活性化するパスを同定した。**Elk1** 活性化においては、**ELK** によるリン酸化が主要経路であり **JNK** の約 2.5 倍、**p38** の約 5 倍の相互作用強度を示すことを推定した。一方、従来の遺伝的アルゴリズムでは信頼に足る結果を得ることができなかった。この結果は、新規開発法の有効性を示すと共に、**ELK** が主要経路であることは従来の知見と一致する点はもちろんであるが、生きた細胞内で相互作用強度の定量的な推定に成功したのは世界で初めてである。

また開発した手法について微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化ソフトウェアとして、「超微蛍光レポーター遺伝子画像解析システム」、数値化を含む数理解析を実装したソフトウェアとして、「細胞アレイによる主要パス高精度同定システム」を作成した。特に後者は、数理解析に不案内な利用者の利便性を考慮して、**KNIME (<http://www.knime.org/>)** によって可視化と各解析段階のコンパートメント化を実現した。これらのソフトウェアは、コンピュータの **OS** に依存せず通常のパーソナルコンピュータで容易に実装可能であり、本新規開発技術の配布による提供が容易である。

1-2 デバイス関連技術開発

1-2-1 デバイス開発の必要性

現在、全世界で740万人ががんで亡くなっており（2004年現在）、WHOの試算によるとその数は2030年には1200万人に達すると言われている。日本においても1983年を境に男女ともに主要死因の1位が「脳血管疾患」から「がん」へと取って代われ、今日では年間約33万人、すなわち日本人の3人に1人ががんで亡くなっているのが現状である。このがんにおける死因の9割が転移によるものとされる。全国がん（成人病）センター協議会加盟施設での1998年から2001年の診断例を用いた統計によると、全がんにおける臨床病期がステージⅠの場合の5年相対生存率が92%、ステージⅡでは80.8%、ステージⅢでは47.6%である。その一方で、UICC TNM分類では多くのがん種で遠隔転移がその分類条件になっているステージⅣにおいては、驚くべきことに16.9%にまで急激にその値が落ち込んでいる。診断確定時に検出限界以下の転移開始状態である可能性が各ステージの生存率低下の一因と思われるが、上記統計結果より多くのがん種において限局されたがんのコントロールは可能であるものの、遠隔転移を起こした症例では治療効果が非常に低い現状が窺える。

一方、医薬品開発に目を向けると、平成21年9月現在で製薬協に公表されている各フェーズにおいて開発中の100近くの抗がん剤のうち、7割以上が腫瘍増殖の阻害作用を持つものである。これら中でも副作用の激しい化学療法剤は、がん細胞と正常細胞を区別せず分裂中（増殖中）の細胞を標的とするため、一部のがん種を除きがん細胞よりも早く増殖する正常細胞が存在するため、それに影響をきたすことから問題がある。また、通常、がん細胞は全滅する前に薬剤耐性を獲得すること、がん細胞の「親玉」であり、再発や転移の核となる「がん幹細胞」は化学療法（及び放射線療法）では容易に死なないと言われており、やはり腫瘍細胞の根絶は難しいと思われる。次いで約2割を占めるのが血管新生阻害薬である。血管新生を阻害することは、原発巣での腫瘍の増大を抑えられるほかに転移を抑制することもことが期待でき、VEGFRに対する抗体薬であるアバスタチン（一般名ベバシズマブ）などは既に上市されている。しかし最近実験動物レベルの結果であるものの、このVEGFR2に対する抗体（DC101）や多標的受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブを投与すると腫瘍が縮小するが、腫瘍辺縁で浸潤が認められるとの報告がある。また、現在治験中であるインテグリンに対する阻害薬は低濃度ではかえって血管新生を亢進させてしまうとの報告や、この阻害薬によりEGFRを介した細胞運動能の増強が起きるとの報告もあるため併用でその欠点を補うことが重要であると考えられる。このほかには免疫賦活を目的とした薬剤なども開発中である。

しかしながら、最も重要である転移阻害をキーワードとした薬剤開発はほとんど行われていないのが現状である。RANKL 標的モノクローナル抗体であるデノスマブはその中でも骨転移を阻害する薬剤として現在Phase IIIで治験中である。骨転移は骨組織を破壊するためにがん細胞が正常骨に存在する破骨細胞の力を借りることで起こる。すなわち、転移したがん細胞はパラサイロイドホルモン関連タンパク PTHrP を分泌し、これに刺激された骨芽細胞が RANKL を発現する。次に前破骨細胞に RANKL へ結合する RANK が発現され、前破骨細胞が破骨細胞に分化し、その数が増大する。増大した破骨細胞が骨を溶かすことで TGF- β や IGF などが骨から溶け出し、がん細胞の増殖などを刺激するという悪性のサイクルが骨転移巣で生じている。デノスマブはこの破骨細胞分化を抑制するものであるため、他の臓器を遠隔転移先とする場合の抑制には用いることができない。また、細胞増殖に係わるシグナル伝達で重要な役割を担う、世界最初のがん遺伝子である Src を標的としたダサチニブ、ボスチニブ、サラカチニブなどが開発されている。特にサラカチニブの固形がんに対する第1相試験では、細胞運動に関する遺伝子である、focal adhesion kinase (FAK) とパキシリンをバイオマーカーとして用いており、50mg/日、125mg/日、175mg/日投与したところ、免疫組織学的手法により、175mg/日群でリン酸化 FAK およびリン酸化パキシ

リンの減少が見られ、最大耐用量（MTD）は 175mg/日と決定されたという経緯もある。さらに培養細胞レベルではがん細胞の浸潤能が低下していることが確認されていることから、転移抑制としての効果が期待されている。

以上のことから転移の本質を理解し、創薬ターゲットやバイオマーカーを同定することは最重要課題である。1972 年以降 NCI（米国国立癌研究所）の助成金で転移に焦点を当てた研究提案は全体の 0.5%以下であった。また、2008 年度の NCI の研究助成金 128 億ドルのうちの 2.9%が転移をキーワードとしたものであり、前年の 2.7%からほとんど変化していない。がん全体の研究規模に比して転移研究が占める割合があまりにも少ない背景に、転移という現象が前述のように非常に複雑で実験的に再現解析することが難しいことが挙げられる。

そこでこれらの欠点を踏まえ、より生体内での状況を反映した、新たな切り口のがん浸潤・転移能検出デバイスを構築するべく研究を展開した。

1-2-2 デバイス開発

上述のようにがんの浸潤・転移機構の解明は、がん治療や創薬における最重要課題である。そこで当該プロジェクトでは浸潤に対して、細胞膜修飾剤（Biocompatible anchor for membrane: BAM）を用いて疑似組織モデルへのがん細胞の浸潤を評価できるようなデバイス開発を行った。また、転移に対して細胞の運動性を指標とした浸潤転移マーカーを探索するための細胞運動機能を評価することが可能であるデバイス開発を行った。

上記のがんの浸潤・転移機構の解明に付随して細胞に対してターゲット遺伝子、タンパク質を導入することは非常に重要である。また、導入した遺伝子等に対して、これらを適切な時間に発現するよう制御することが精緻な解析には重要である。しかしながら、現在主流となっているリポフェクションでは細胞種によって導入効率が著しく変わり、遺伝子の発現も細胞に強く依存するため調節することが困難である。そのため遺伝子導入に関して電解集中型エレクトロポレーション法の開発を行った。これによって非常に低侵襲で細胞に対して、遺伝子、タンパク質等の導入が可能となった。さらに細胞に対して物理的に遺伝子等を導入する手法は細胞種によらず、遺伝子等を導入することが可能であることを示しており、非常に高い価値を持つと考えられる。また、該当技術はその簡易な構造により、デバイス化が容易であり、また技術的にも簡便であることから新たな低侵襲遺伝子導入法として非常に高い価値を持つと考えられる。次に導入した遺伝子の時間的制御ではプラスミドにケージド化合物を結合させることによって転写翻訳を光照射のタイミングで発現させる技術を開発した。これにより、従来法よりも弱い光毒性で遺伝子発現誘導が可能となると共に、遺伝子のみならず、shRNA や RNA アプタマーへの転写も同様に光制御できる技術であるので、目的遺伝子のノックダウンや目的タンパク質の活性阻害についても時間的制御が可能と考えられる。上記のように、がんの浸潤転移評価デバイス開発および対象細胞に対してターゲットとなる遺伝子を低侵襲に導入し、かつその発現を任意に調節できるようなデバイス開発を行った。

1-3 応用研究

1-3-1 創薬の現状

1980年代中盤以降のがんの分子生物学の進展によって、がん細胞により高い選択性を持ち、副作用が少ない薬剤を目指して分子標的薬の研究が行われてきた。さらに、ヒトゲノムの解析が進み、細胞のがん化、増殖、アポトーシスからの逸脱等に関係する遺伝子の同定やその機能解析から、個々のがん細胞の異常増殖や細胞死誘導に関わる標的候補分子を同定し、それに対する選択的な薬剤を創薬としていくという“ゲノム創薬”のコンセプトが登場した。その流れの中で、製薬企業は精力的に分子標的薬の創薬研究を行い、その結果として、慢性骨髄性白血病（CML）の原因遺伝子である Bcr-Abl を阻害するキナーゼ低分子阻害剤グリベックなど、既存の非特異的な細胞毒と異なる標的分子とメカニズムを有する薬剤が標準治療薬としての治療効果や患者の QOL 向上に貢献するようになってきた。しかしながら、数多くの分子標的薬が開発ステージあるいは臨床現場に登場してくるにともなって、当初の理想とは異なる問題点や限界も明らかになってきている。第一に、単一遺伝子の阻害による薬効の限界が挙げられる。第二に、非感受性患者や耐性獲得患者の問題がある。分子標的薬は選択的に標的を狙うが故に、その分子に異常がある患者には効果があるが、そうでない患者は非感受性であることが想定される。また、標的に合致した患者を選択して選択的な分子標的薬で治療したとしても、標的分子そのものの耐性変異、標的分子の増殖シグナルとは異なるバイパス経路の活性化などによって非感受性となることや、治療の過程で耐性が出現するという事実も明らかになってきている。

分子標的薬の効率的な創薬を目指す上では、感受性（非感受性）バイオマーカーを設定して薬剤開発や市販後の患者選択を行うことが重要なポイントであり、分子標的薬時代の“critical path”として、米国 FDA の答申でも重要課題として掲げられている項目である。グリベックやセツキシマブに代表される分子標的薬の多くは、がん細胞増殖に直接関与する分子を標的としており、細胞の増殖停止や細胞死誘導をアウトプットとしている点では既存抗がん剤と同様である。一方、次世代の分子標的候補として、がんの転移・浸潤、細胞分化、腫瘍環境、腫瘍免疫、がん幹細胞等などの細胞機能に着目した創薬も一つの流れとなってきた。

このような新しい分子標的の探索においては、より複雑な細胞機能の組み合わせ（増殖、転移・浸潤、細胞分化、腫瘍環境インターアクション、腫瘍免疫、がん幹細胞）について、細胞全体として起こっている現象を解析していく技術の重要性が増してきている。

1-3-2 ハイスループットの限界点と可能性

従来 DNA チップや質量分析装置を利用して、疾患細胞と正常細胞で発現している遺伝子やタンパク質の比較によって、疾患特異的に変動する遺伝子の探索を行っている。近年はこの探索スピードを速めたハイスループットスクリーニングによって創薬の効率化を計ることが主流となっている。しかしながら、現在の創薬を鑑みると、欧米のメガファーマにおいても、巨費を投じ遺伝子を網羅的にスクリーニングし創薬の効率化を図るもその上市効率は徐々に悪化している。国内においても 2003 年から 2007 年までの 5 年間に於いて、新薬の候補化合物が 563,589 個、新薬として承認されたものは 26 個であり、その確率は 21676.5 分の 1 であり、上市効率は決してよいものではない。これはスクリーニングには創薬と疾患に関して遺伝子による対応が前提となっているが、実際は疾患に対して原因となる遺伝子は一つではなく、複数の遺伝子が発現量を時間および状況に応じて変化することによって発生していることが多いと考えられるためである。すなわち、薬剤は目的とする機能を達成するために細胞内のパスウェイの変化を引き起こすことが求められる。しかしながら、パスウェイが様々なバイパスを持つことを考慮するとこのような薬剤は単独で達成することは非常に難しく、多剤によってパスウェイを変化させることが重要だと考えられる。そのため、ハイスループットスクリーニング(HTS)によって顕著な抗がん剤とな

るような特定の標的は発見することは困難である。換言すると現状の創薬の上市効率 は従来の HTS による標的探索の限界点を示していると考えられる。

1-3-3 パスウェイ解析による応用

次世代分子標的薬のスクリーニングは、これまでに製薬会社が行ってきたような、単離したタンパクや酵素を用いた大規模ハイスループットスクリーニングの時代から、細胞増殖をはじめとした細胞機能に關与する細胞内シグナル経路（パスウェイ）上の分子を標的群と考える“Pathway-driven drug discovery”や、細胞そのものを用いて複数の機能や表現型を指標として阻害剤を探索する“Multi-parameter phenotypic 創薬”の時代へシフトしている。単離した標的分子やその下流、上流のシグナルのみではなく、それらが相互作用する細胞そのものを扱い、その中で起こっている現象を理解する方法論が重要になっている。

そこで、既存薬併用時に動的に変化する遺伝子や細胞内シグナル伝達や關連する遺伝子発現の変動など“パスウェイ”を併用時の創薬標的として選択するアプローチを試みた。具体的にはパクリタキセル感受性をケースとして取り上げ、臨床での感受性、非感受性が明らかになっている患者腫瘍組織からのマイクロアレイ解析で得られたスナップショット（静的なプロファイル）の比較から得られた感受性因子候補遺伝子群から、従来のようにそのまま網羅的なデータ統計解析手法によって一挙に絞込みを行う前に、パスウェイ解析とセルアレイ実験を組み合わせる候補遺伝子 siRNA とパクリタキセルの併用実験データを取得するサイクルを繰り返すことにより、感受性に関連するパスウェイを絞りこむ方法を試みた。この方法により、網羅的なマイクロアレイとパスウェイ解析でフィルターをかけた候補遺伝子 siRNA の機能的な寄与（=パクリタキセル抗細胞活性増強）を加味しながらパスウェイを絞り込むことができると同時に、TFA を用いて細胞の機能データを一挙に取得することによる効率的な候補遺伝子絞込み技術としての可能性を示すことを目標とする。

また一方、今後こういった動的パスウェイの解析に必須になると考えられる基盤技術開発にも着手する。具体的には、細胞内の遺伝子やシグナル伝達の流れを時系列で解析する技術への取り組みが挙げられる。これが可能になればパスウェイ間の相関強度を評価しながら、奏効のある干渉点・干渉方法を抽出することにより、併用時に狙うべきパスウェイ標的を絞込み、そこに作用する併用薬を選択することや、併用時に動く標的を狙う新たな創薬戦略に有用な技術となることが期待される。

第2章 時系列解析技術開発

2-1 時系列測定技術の必要性

【時系列の技術開発について】

遺伝子発現は細胞内の現象を司ると考えられ、細胞内の現象を明らかにするために現在はある特定の時間の発現量を測定することが主流である。ところが遺伝子をはじめとする細胞内の様々な分子はお互いに相互作用するため、その量は経時的に変化する。すなわち細胞内の現象を司るのはこの量的な変化であることが考えられ、これはある特定の時間の遺伝子発現量を測定するだけでは明らかにすることは難しい。すなわち、その発現量の経時的な変化を測定し評価することによりパスウェイの流れを推定することが細胞内の現象を把握する上で非常に重要であると考えられる。しかしながら細胞に対して遺伝子導入や刺激への応答による遺伝子発現はいつ始まるのか、またどのように変化していくのかを正確に測定する方法は確立されていない。また、細胞内の遺伝子発現は細胞の状態、染色体内の変異による遺伝子数の違いによって著しく異なることが明らかとなっており測定された発現量を単純な平均を用いるのみではその現象を正確に把握することは極めて困難であると考えられる。よって細胞内の現象を正確に把握するためには、個々の細胞を正確に認識し、その発現量を正確に測定し数値化することは細胞内の現象の把握するために非常に重要な問題である。また、測定された遺伝子の経時変化の動態解析をするためにはその背後にある支配方程式のパラメータを適切に推定することが必須である。そのため、細胞内の現象を理解するためには、正確な細胞認識による、遺伝子発現の経時的な観測および数値化、計測データの背後にある支配方程式の適切な比較を行うための開発が重要であるといえる。

パスウェイ解析にあたって重要であることは対象となる遺伝子に関して経時的に測定が可能でありかつ数値化が可能であることである。現在細胞のライブセルイメージングが非常に重要な分野になっているにも関わらずその解析には ImageJ あるいは計測機器付属のソフトを利用するに留まっている。また、細胞毎の蛍光強度はお互いに著しく異なるため、単純な平均化によって代表することが非常に困難である。更に、細胞の中には通常の制御状態を逸脱して非常に強い蛍光強度をもつ細胞も存在する。これらのことから、パスウェイ解析のための時系列変化の測定には多量の細胞を同時に認識することのみならず、それらの中から制御を逸脱したと考えられる細胞を排除すると共に、非常に微弱な蛍光を持つ細胞を認識し数値化することが重要となる。

【研究成果および研究実施機関について】

本プロジェクトでは東京大学（三宅研）と産業技術総合研究所（産総研）生命情報工学研究センター（CBRC）によって微弱蛍光を持つ細胞のみを認識し数値化するためのソフトウェアを開発し、また数値データに基づき、統計検定による定性的解析による活性化サブネットワークの同定と、同定された活性化サブネットワークにおけるパラメータ値の定量的推定による主要経路の推定を行った。これらの開発した技術を検証するために特異的転写因子蛍光計測技術を開発し実験を行った。更に、得られた数値の理論的な解析を行うための技術開発として、京都大学により、得られたパスウェイの定常状態、頑健性、パスウェイ補完にかかる計算時間の理論解析等が行われた。

また、細胞を測定するためのハードウェアとしては、新たに設計した生細胞時系列局所観察装置を開発した。これは、それまで、時系列を測定していたオリンパス（株）製の生細胞観察装置に対して、半導体技術を応用することで、撮像までにかかる時間を大幅に短縮することが可能となり測定のスループットを大幅に増加させることが出来た。また、それまでの生細胞観察装置が耐久性に対して問題があるのに対し、機械駆動部を強化することで耐久性の大幅な改善を行い安定的な稼働を可能にした。

一方、遺伝子発現に関してその染色体の遺伝子増幅による変化測定は産総研 セルエンジニアリング研究部門（RICE）（つくば）および山口大学によって、遺伝子発現の開始点の測定に関しては東京大学（三宅研）によって技術要素開発がなされた。また、時系列データを有効に活用するにあたり、プロジェクトに関わる各機関によって横断的にデータを活用出来るように集中研に200 テラバイトの大型ストレージを構築し、プロジェクトにおいて発生する大量の時系列データを廃棄することなく蓄積・解析することを可能にした。

本章で述べる技術開発成果は次の通りである。

- 1) 時系列測定技術の必要性
- 2) 時系列測定技術の開発
- 3) 時系列解析技術の開発（微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化アルゴリズム開発）
- 4) 時系列解析技術の開発（細胞時系列データに基づく主要パス統計検定）
- 5) 時系列データを用いたパスウェイ解析（動態解析におけるパラメータ推定精度の向上）
- 6) 新規開発法のソフトウェア化
- 7) パスウェイの理論的解析手法開発
- 8) 染色体変化による遺伝子発現の評価
- 9) 遺伝子発現の開始に関する評価技術
- 10) 時系列データ格納用ストレージおよび時系列局所細胞モニタリング装置の開発
- 11) 補遺（精密解析が必要な理由）

2-2 時系列測定技術の開発 (産総研 CBRC、東京大学 三宅研)

生体内では複数の転写因子が協調して一個の遺伝子発現を調節する。多数の因子が関わる転写因子複合体の DNA に対する結合はより安定となり、結果、産生される mRNA 量も多くなる。しかし、今回我々が試みた特異的転写因子蛍光計測技術 (transcription cis-element reporter system) では、活性を見るべき転写因子は一種類である。そのため、転写複合体の DNA への結合は不安定であり、mRNA 量も少なくなる。それゆえ transcription cis-element reporter システムを用いて、一分子で一蛍光しか取れない蛍光タンパク質をレポータに用いる事はこれまで不可能とされて来た。今回我々は、細胞を長時間生かしたまま、その顕微鏡画像の時系列データを大量取得する事が出来る細胞画像自動取得装置をデータ取得に用いる事により、蛍光タンパク質をレポータとする transcription cis-element の活性測定に成功した。従来の transcription cis-element reporter システムではレポータとして酵素 (アルカリフォスファターゼ、ルシフェラーゼ等) を用いていたため、計測に当たっては、細胞を破壊して酵素を抽出する必要がある。そのため同じ細胞を用いて時系列データを取る事は不可能であった。また、酵素活性の測定には最低でも 10^4 オーダーの細胞数が必要であるため、得られたデータは細胞集団としてのデータであった。蛍光タンパク質をレポータとして用いる事によって、一個、一個の生きた細胞からの連続した時系列データを取る事が可能となった。時系列データの取得の際にはヒト由来細胞である HeLa, HeLa-TG, MCF7, T24, オリゴデンドロサイト、マウスでは NIH3T3 などを用いてデータの取得を試みた。本手法により、細胞生物学の新しい可能性が開かれるものと思われる。

2-2-1 レポータコンストラクト導入実験条件の決定

時系列撮像に先立ち、まず最適なレポータコンストラクトおよびその実験条件の検討を行った。単一種類の転写因子の活性化を計測する transcription cis-element reporter システムで刺激応答的に増加する蛍光量は非常に微弱であるため、有意な実験データを得るには刺激非依存的に産生されているバックグラウンドレベルの蛍光タンパク質の量を低く抑える事が必須である。そのためには、モデル細胞のゲノムにレポータコンストラクトを取り込ませた安定発現株の構築が必須である事を実験的に示した。まず、同システムの適用プロトコルに則って、レポータコンストラクトをプラスミド DNA ベクターに搭載して遺伝子導入し、その一過性発現系で計測を行う手法でデータ取得を行った。ところが、画像データを解析した所、全く刺激応答的な蛍光タンパク質の発現パターンが見られない事が分かった。そこで、レポータタンパク質自体の発現をウエスタンブロットによる生化学的手法により解析したところ、プラスミドベクターの一過性発現系では刺激依存的なタンパク質の量的増加が検出しにくい事が分かった。これに反して、あらかじめレポータコンストラクトをモデル細胞のゲノムに取り込ませた安定発現系では、刺激応答的にレポータタンパク質の増加が見られる事が、ウエスタンブロットにより証明された。この知見に基づき、本実験は全てレポータコンストラクト安定発現モデル細胞を用いて行った。

また、実験は HTS 用のアレイではなく単純な多穴ウェルを用いて行った。この方法については多くの細胞生物学の研究者が通常用いており、細胞に対する影響や特性について比較検討しやすいためである。HTS では多くの実験を一度に行うために、アレイ化によって集積度を上げる工夫がなされることが多い。その際細胞の接着・固定化や、遺伝子導入効率を向上させるために、細胞外マトリックスであるコラーゲンやフィブロネクチンなどのコート剤も多用される様である。しかし、写真 (図 2(2)-1) に示すように、これらの生理活性物質は細胞の性質に大きな影響を与える可能性がある。また、細胞の増殖に影響を与える可能性を評価するため、フィブロネクチンをコートした培養皿に血清応答因子 (SRE) を入れた細胞を播種した後、増殖因子の一つである bFGF に対する遺伝子発現の違いを検討したところ、フィブロネクチンコーティングを行った場合と無い場合で、bFGF の刺激に対する応答が統計的な有意差をもって変化することが分かった。

このことはフィブロネクチンが増殖因子として働いたこと、その結果増殖フェーズでの現象が観察され、場合によっては遺伝子の発現強度も影響される可能性が示唆されたと考えられる。もともとこの様な生理活性分子は、増殖や分化誘導にも係わる物質である。siRNA 実験に供すると、条件によってはバイアスのかかった結果が得られる可能性に留意すべきであろう。

総じてアレイ技術に代表される HTS 技術に関しては細胞機能を調べるための簡便法として大まかな選択には一定の有用性が想定されるものの、本研究の様な、生体内の現象・遺伝子の相関などを精緻に再現し解析する方法として適用できるかどうかについては、現段階では慎重な対応が必要であろうと考えられた。またこのような問題を克服できるかどうかについては今後の研究を待ちたいところである。

2-2-2 Transcription cis-element reporter システムの確立

オワンクラゲ *Aequorea Victoria* から分離された緑色蛍光タンパク質 GFP ならびに、その類似タンパク質は、生細胞内で基質非依存的に蛍光を発する。蛍光はタンパク質内の電子転移反応に依って行われ、ATP 等のエネルギー分子を必要としない。蛍光タンパク質の実験系への導入によって、一個一個の細胞もしくはタンパク質を、細胞を生かしたままの状態を観察する事が可能となった。transcription cis-element reporter system は、個別の転写因子に固有の認識配列だけをプロモーター領域に持ち、その転写因子の活性化だけを、プロモーター領域の下流に繋いだレポータータンパク質遺伝子の発現に依ってモニターするシステムである。これまで細胞内シグナル伝達経路の解析に多用されてきた。transcription cis-element reporter system のレポーターとして蛍光タンパク質を使う事が出来れば、特定の転写因子の活性化を生きた細胞を観察する事でリアルタイムに捉えることが出来る。また蛍光タンパク質の種類を変える事に依り、一個の細胞内における複数種類の転写因子の活性化をそれぞれ異なった色（青、緑、黄色、オレンジ、赤など）で個別に解析する事も可能となる。しかし、これまで蛍光タンパク質を transcription cis-element reporter system に用いる事は不可能であると言われてきた。まず第一の理由は、transcription cis-element reporter system の人工プロモーターの転写活性が非常に低い事である。一個の転写因子が認識する DNA の特異配列は非常に短い、例えば転写因子 AP1 の場合、TGA(G/C)TCA という 7塩基対しかない（図 2(2)-2）。わずかこれだけしか DNA に結合する部位が無いので、安定な転写複合体 transcriptosome を形成する事が出来ないため、刺激応答的に活性化した転写因子が結合しても、産生されるレポーター遺伝子の mRNA 量は比較的強く押さえられてしまう。結果、出てくるレポータータンパク質の量も多く無い。従来の transcription cis-element reporter system では、この欠点を補うため、レポーターとして基質依存的に発色、発光する酵素（アルカリフォスファターゼやルシフェラーゼ）を用いていた。この手法であると一個の酵素が 10^7 個の基質を分解するので、産生されるレポータータンパク質がたとえ僅少であったとしても、その存在を捉える事が出来る。しかし蛍光タンパク質の場合、タンパク質 1分子は 1励起光につき 1蛍光しか発し得ないので、酵素特有のシグナル増幅効果は期待出来ない。つまり非常に微弱な蛍光シグナルを捉える技術が必須となる。第二の理由もまた transcription cis-element reporter system の人工プロモーターの特性によるものであるが、このプロモーターは短い上に、特定の転写因子以外の結合配列を持たないので、転写の活性化同様、転写の抑制のコントロールも掛かりにくい。すなわち、刺激非依存的に、有る程度の量のレポータータンパク質がいつも垂れ流しに発現されている。このようなバックグラウンドレベルのタンパク質発現は常に刺激依存的なレポータータンパク質の増分を計る時に障害となる。レポータータンパク質が不安定なタンパク質であって、産生後すみやかに分解されるならばまだしも、系統発生的にも遥かに離れたオワンクラゲ等に由来する蛍光タンパク質を代謝する専門の分解系を持つ哺乳類細胞は無いので、蛍光タンパク質を哺乳類細胞に発現させた場合の半減期は異常に長い（48-96 時間）。つまり蛍光タンパク質をレポーターとする transcription cis-element reporter system は強烈なバックグラウンドを排除しなければ、真の刺激応答的な蛍光を計る事が出来

ないということである。

我々はこれらの問題を解決すべく幾つかの対策を講じた。

1) まずレポータに用いる蛍光タンパク質を、哺乳類細胞内で分解されにくい緑色蛍光タンパク質 EGFP から、EGFP にタンパク質不安定化 PEST 配列を組み込む事により哺乳類のユビキチンプロテアソーム系で分解されるように改変した不安定化タンパク質 d2EGFP (半減期 2 時間) に変更した。レポータ d2EGFP の測定は困難を極めた。光が余りにも微弱な為、蛍光の測定時間を長くした所、励起光によって細胞を焼き殺す事となった。そのため励起光を減衰させる ND filter を設置したが、さらに露光時間が長くなるようになった。

2) d2EGFP の蛍光強度が実用上どうしても弱いので、d2EGFP よりも蛍光強度が高い (10~100 倍) とされる、黄色蛍光タンパク質 YFP 改変不安定化タンパク質 d1Venus (半減期 1 時間) をレポータタンパク質として本実験に用いた。

3) 測定装置も微弱な蛍光に対応すべく改良した。従来使用していた、オリンパス (株) 製の細胞画像自動取得装置 (EVE) の顕微鏡部分は通常の倒立型蛍光顕微鏡を用いていたので微弱蛍光の取得には使い勝手が良く無かった。そこで、顕微鏡部分を共焦点レーザー倒立顕微鏡とした BTS1000 を作製した。これによって画像明度は 10 倍以上向上した。

4) さらに外部刺激による、レポータ蛍光タンパク質発現のタイミングを確認するため、生化学的手法での裏付け調査を行った。AP1-d2EGFP レポータコンストラクトをプラスミド DNA としてモデル細胞 NIH3T3 に導入した一過性発現系で見ると、同じコンストラクトを前もって NIH3T3 のゲノムに取り込ませた安定発現株 NIH3T3/AP1-d2EGFP について、TRAIL 刺激後のレポータタンパク質 d2EGFP の発現をウエスタンブロット法で確認した (図 2(2)-3)。その結果、レポータ安定発現株については TRAIL 刺激後 8 時間以降にレポータタンパク質 d2EGFP 量の増大が見られたが、プラスミドをベクターとした一過性発現系では TRAIL 刺激応答的なレポータタンパク質の変化は見られなかった。この結果から、以後の実験はレポータの安定発現株を構築して行った。なお、レポータタンパク質を不安定化していない EGFP にした系では一過性発現系ばかりか安定発現株でさえも TRAIL 刺激によるレポータの発現増大は全く見られなかった。この実験結果から、少なくとも不安定化していない EGFP は transcription cis-element reporter system の測定には不向きであることがわかった。

5) Neomycin 耐性遺伝子 neo^r を選択マーカーとする、レポータ安定発現株作製用プラスミドベクターを d2EGFP、d1Venus それぞれにつき 19 種類、都合 38 コンストラクトを構築した。またこれらのコンストラクトを用いて作製した transcription cis-element reporter 安定発現モデル細胞は以下の通りである、NIH3T3 (AP1/d2EGFP、AP1/d1Venus、SRE/d2EGFP、SRE/d1Venus、P53/d2EGFP、P53/d1Venus、CRE/d2EGFP、CRE/d1Venus、NFkB/d2EGFP、AP1/EGFP、P53/EGFP、NFkB/EGFP) 13 株、Hela-TG (AP1/d2EGFP、P53/d2EGFP、NFkB/d2EGFP、AP1/EGFP、P53/EGFP、NFkB/EGFP) 6 株、MCF7 (AP1/d1Venus、SRE/d1Venus、P53/d1Venus) 3 株、T24 (AP1/d1Venus、SRE/d1Venus、P53/d1Venus) 3 株、計 25 株。各細胞株は G418 で各々 6 週間以上セレクションをかけ、ほぼ全ての細胞がレポータコンストラクトを有する事を確認した。このように構築した、安定発現株細胞であるが、全ての細胞が AP1-d2EGFP レポータコンストラクトを持っている筈の NIH3T3/AP1-d2EGFP 安定発現細胞であっても、TRAIL 刺激応答的に生きた細胞レベルで刺激応答的な蛍光増大がみられるのは 5% 以下に過ぎない事が画像データならびに蛍光励起セルソーター FACS のデータから分かった。

6) そこで、レポータコンストラクトに含まれる転写因子特異的結合部位の数を増やして、もう一度アッセイを試みる事にした。AP1 レポータの場合、オリジナルのプロモーター領域には 6 個の TGA(G/C)TCA 保存配列がある。この 6 個のセットを切り出して、タンデムにつなぎ換え、それぞれ 2 倍 (2N、保存配列 12 個)、3 倍 (3N、保存配列 18 個)、4 倍 (4N、保存配列 24 個) としたレポータコンストラクト (d1Venus) を作製し、モデル細胞 NIH3T3 に導入し、安定発現株

を樹立して後、蛍光測定を行った（図 2(2)-4）、その結果、2N コンストラクトについてはオリジナルに比して特段の優位性を認めなかったが、3N および 4N コンストラクトでは明白なレポータタンパク質 d1Venus の TRAIL 刺激応答的な発現量の増大を認めた。4N コンストラクトについては、刺激時の誘導蛍光量は最大値を示したが、刺激非依存的なバックグランドレベルの蛍光強度も強かったので、バックグランドレベルがオリジナルと変わらない3N コンストラクトを採用し、NIH3T3/AP1 (N3)-1d1Venus レポータ安定発現株細胞として実験に用いた。また、SRE レポータについても同様に NIH3T3/SRE (N3)-d1Venus レポータ安定発現株細胞を樹立した。

7) 細胞が細胞分裂して増殖する場合、延ばしていた突起を引っ込め、球状化する。レポータとして用いる蛍光タンパク質は、哺乳類細胞には本来存在しない外来性の小型タンパク質であるから、細胞質にも核にも部位非特異的に分布している。細胞が球状化すると、それまで広範囲に広がっていた蛍光タンパク質が凝集して見かけ上の密度を増し（細胞の体積は変わらないが、顕微鏡観察面である上方投影面積の縮小による見かけの濃縮）により、あたかもレポータタンパク質の発現量が増したような誤った情報を与える可能性があった。時系列画像データに基づいて、そのような細胞の情報を除外するという作業も産総研 CBRC のドライラボチームによって行われたが、実験担当でもモデル細胞を、あらかじめ細胞分裂阻害抗生物質マイトマイシン C により前処理することによって、細胞分裂をほぼ完全に押さえ込んでから測定を行った。

8) マイトマイシン C 処理は、細胞に相当のダメージを与える。そのためしばしば細胞が時系列データ取得中に斃死する事があった。斃死を抑えて正常なデータを取得するのは熟練を要するので、より簡便な血清飢餓による細胞増殖の抑制も同時に行った。増殖系 MAPK(ERK1/2)では適用が難しかったが、TRAIL 刺激のようなストレス系 MAPK (JNK1~3, P38 α ~ δ)の計測では有効な手法であった。

以上、種々の実験技法の改良を重ねた結果、従来不可能とされていた蛍光タンパク質をレポータとした transcription cis-element reporter system を用いて、転写因子 AP1、Elk-1 (SRE)、P53 それぞれの活性化を、個々のマウスならびにヒト生細胞内で、時系列細胞画像データとして取得する事に成功した。

2-2-3 MAPK の siRNA による遺伝子発現抑制

本研究の目的は、細胞外部刺激から転写因子活性化に到る、細胞内シグナルトランスダクションに関わるタンパク質の遺伝子発現を個々に特異的な siRNA によって抑制し、そのタンパク質の細胞内の量を低下させる事により、シグナルトランスダクションにどのような影響が出るか、レポータタンパク質の発現から解析する事である。研究計画当初は産総研 RICE（臨海）が開発したトランスフェクションアレイ技術で解析を行うという事であったので、transcription cis-element reporter system のレポータコンストラクトを載せたプラスミドと遺伝子抑制用の siRNA を、固相トランスフェクション法によって同時にモデル細胞に導入する実験系を立てていた。しかし、前項で述べたように、プラスミドでレポータコンストラクトを導入する一過性発現系では transcription cis-element reporter system がワークしない事が明らかとなった。また、トランスフェクションアレイで用いる固相トランスフェクション法では、トランスフェクション溶液塗布後の乾燥固定時に、ウェル中央にトランスフェクション試薬が凝集する反面、偏縁部には全く残らず、到底均一なトランスフェクションが期待出来ない上に、細胞懸濁液を注入した時点で、乾固したトランスフェクション試薬が混ざって、異なるスポット間の siRNA が混ざってしまうという恐れがある。さらに、トランスフェクションアレイで用いる固相トランスフェクション法では、プラスミド DNA も siRNA も同時に混合し、同じトランスフェクション試薬で細胞に導入することになっていたが、長鎖のプラスミド DNA と短鎖の siRNA とでは、トランスフェクションの至適条件は大きく異なるので、結局の所、どちらの核酸分子も導入されない可能性がある。固相トランスフェクションの利点として、細胞毒性が不可避なトランスフェクション試薬の使用量が少ない

ということが有ったが、その濃度にしても 10 分の 1 程度に抑制したに過ぎず、なおかつガラス上に乾燥固定させるため局所濃度はむしろ高くなっている事、また液相でトランスフェクションを行うため、トランスフェクション試薬の除去が容易な従来法と異なりリバーストランスフェクション法では、トランスフェクション試薬を培養の最後まで除去出来ない事等があるため、かえって細胞の生存率が悪くなるという事例も報告された。そこで、本実験では異なる遺伝子に対する siRNA が混ざり合う心配の無い、一個一個仕切りの有るウェルプレートを用いて、レポーターコンストラクトをあらかじめゲノムに取り込ませたモデル細胞レポーター安定発現株に、技術的成熟度がより高い液相ベースのトランスフェクション法を用いて siRNA を導入し、かつまた、トランスフェクション操作完了後は、細胞をトリプシンで剥がして洗浄した後、再びウェルプレートに蒔き直すことにより残存するトランスフェクション試薬を系より除去した上で計測を行った。siRNA の効果が見られるのには、通常 20 時間以上かかる。遺伝子抑制効果が最大であるのは 48 時間～72 時間とされているので、本研究では siRNA 導入後 48 時間の細胞を用いて実験を行った。また、siRNA の遺伝子発現抑制効果には標的遺伝子毎に差がある。100% 近く抑制出来る場合もあれば、場合に依っては全く無効である場合も有るので、各 siRNA 毎にウエスタンブロットに依って標的タンパク質発現量の抑制効率を測定した (図 2(2)-5)。

2-2-4 MAPK の化学阻害剤による酵素活性抑制

siRNA による MAPK 遺伝子発現抑制法と平行して、化学阻害剤による MAPK 活性の阻害も試みた。前述のように siRNA の系では、遺伝子毎に抑制効率に差があり、多くの場合 100% の抑制は望めない。また、実際のところ siRNA の効き方に相当のムラが有り、かつ処理後の時間に依って遺伝子抑制効果変動する事など、実際の運用上問題が多かったため、前処理時間が短く、抑制効率もほぼ 100% と見なせる MAPK の化学阻害剤を用いた実験も行った。ただし、これにより増殖系 MAPK である ERK (2 種類)、ストレス系 MAPK である JNK (3 種類) と p38 (4 種類) をそれぞれ一種類、全部で 3 種類の阻害剤で抑制する事により解析の細かさは失われた。ただし、反面、関連要素の単純化ということにもなったので予備実験の系としては有効であった。

2-2-5 TRAIL 刺激シグナルトランスダクション下流分子としての転写因子 CREB の発見

文献検索の結果、AP1 とは別に TRAIL 受容体下流に cis-transcription factor SRE と CRE に結合する因子が存在する可能性が示唆された。これについてもレポーターアッセイを行い、その結果、SRE については明示的な活性は出なかったが、CRE については TRAIL 添加後に抑制的な効果が出る事が分かったので、DNA chip による解析データと合わせて発表した(図 2(2)-6)。

2-2-6 抗腫瘍薬 Ashwagandha leaf extract のシグナル経路解析

我々が開発した手法を実地に応用して有効性を検証するために、Ashwagandha leaf extract の薬理作用の解析を行った。まず、Ashwagandha leaf extract の投与によるストレス対応 MAPK の活性化をレポーター安定発現モデル細胞株 NIH3T3/AP1(N3)-d1Venus を用いて測定を行った。また、当方からレポーター AP1(N3)-d1Venus プラスミドを供給して産総研 RICE (つくば) で作製した、TIG3-AP1 細胞でも測定を行った。RICE (つくば) から提供を受けた p53 レポーターコンストラクト (p53-13) を組み込んだ新規 d1Venus vector も作製し、NIH3T3 と TIG3 細胞の安定発現株を作製して測定を行った。

2-3 時系列解析技術の開発（微弱蛍光細胞時系列画像データの数値化アルゴリズム開発） （CBRC、東京大学 三宅研）

当初蛍光顕微鏡から取得される大量の細胞画像データから、細胞の形状・特徴等を自動的に数値化することができる画像解析システムを開発した。しかし、細胞種やレポータ遺伝子等の実験条件を変更したときに取得される画像データは、これまでの限られた実験条件下で取得された画像データとは大きく異なるため、この画像処理システムでは、細胞抽出の精度に課題が生じた。そのために画像処理システムを改良し、あらゆる実験条件下で取得された画像データから細胞輪郭を精度良く抽出できるように改良、高精度化を図ると共に、画像解析システムが出力する個々の細胞の計測結果と 1 細胞トラッキング結果を用いて時系列代表値を出力する機能を追加し、さらに、1 細胞トラッキング処理方法を見直し、画像処理システム全体の出力結果の精度向上を図るための開発を行った（図 2(3)-1 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J）。具体的な技術については、以下の通りである。

細胞輪郭抽出処理は、入力画像からノイズやバックグラウンドの輝度ムラを除去した後、閾値処理を行い、細胞の輪郭線を抽出する処理である。当初開発した画像処理システムでは、ある一定の閾値を用いて細胞の輪郭線を抽出したが、実験条件等の変更により取得される画像データの特徴が大きく変化し、視覚的に確認できない程度の微弱な発光の画像データも取得されるようになった。そのために単一の閾値を用いる細胞輪郭抽出処理ではこれらの画像から細胞の輪郭線を精度良く抽出することは困難であり、その結果計測精度が悪くなることが判明したため、細胞輪郭抽出処理における閾値処理を単一閾値処理から多段階閾値処理に変更し、細胞抽出精度が向上するように改良した。多段階閾値処理は、各閾値で抽出された細胞の輪郭線の和を細胞の輪郭線として出力する。このとき細胞以外の領域も細胞として抽出されるため、多段階閾値処理実装の際は、ノイズ除去アルゴリズムも実装した。

1 細胞トラッキングツールは、画像の端に写っている細胞のトラッキングに対応していないため、これらの細胞の計測値が誤差となって現れる。トラッキングエラーを削減するため、プログラム内部で画像の端に写っている細胞をトラッキングするよう改良し、同時に処理アルゴリズムを見直し、トラッキング精度の向上を図った。

また、画像計測ツールが出力する個々の細胞の計測結果を用いて外れ値検定を行い、外れ値以外の計測結果のみ出力するツールを開発し、さらに、画像解析ツールが出力する個々の細胞の計測結果と 1 細胞トラッキングツールの出力結果を用い、抽出した細胞の総数や平均輝度などの時系列代表値を出力するツールを開発した。実装の際、処理開始時にユーザが指定した時刻までに出現した細胞は、代表値算出から除外するようにした。

この技術により、1 細胞の染色体に安定的に組み込んだ、転写因子の既知結合配列のみから成る極めて特異的に転写部位に結合するレポータ遺伝子の遺伝子産物が発する微弱な蛍光を生きた細胞内の転写因子活性時系列データとして計測することに成功した。

2-4 時系列解析技術の開発（細胞時系列データに基づく主要パス統計検定） （産総研 CBRC、東京大学 三宅研）

画像解析ツールが出力する個々の細胞の計測結果から求めた抽出した細胞の総数や平均輝度などの時系列代表値に基づいて、時系列データの統計検定手続きを構築した（図 2(4)-1）。2つの時系列計測データについて、まず各計測時点での検定は **Z test** を行い、時系列データのどの時点の計測値が有意に異なるかを判定する。さらに、**Fisher's C test** により各時点の検定結果から、時系列データ全体について有意確率を推定する。この解析により、外的刺激に応答するか否かの推定およびその反応時間推定が可能になる。さらに、計測分子と相互作用が予測される分子に関するタンパク質阻害剤や siRNA 遺伝子干渉実験により得られるデータを解析することで、当該分子が刺激応答パスウェイとして活性化されているかを定性的に判定することが可能になる。

2-5 時系列データを用いたパスイエイ解析（動態解析におけるパラメータ推定精度の向上）
（産総研 CBRC、東京大学 三宅研）

システム生物学の重要な課題の一つに、生体分子ネットワーク動態解析がある。一般的な生体ネットワーク動態解析では、まず実験解析結果などの生物学的知見に基づき、分子反応モデルを構築する。次に、分子反応の様式に基づいて微分方程式を定式化する。そして最後に、実験計測データに基づいて反応パラメータの数値解析を実行する。大まかな手続きを書きまわせば以上のように単純化されてしまうが、各段階で生体分子解析特有の様々な問題がある。まず、細胞内の分子間の関係性は、細胞の置かれた環境によって著しく変化することが知られる。これは、生体分子ネットワークモデルの構築が極めて困難なことを意味する。通常数理解析では、モデルにおいて、関係性の強弱はパラメータ値の大小で表現されるが、関係性の有無は議論されない。ここでは、関係性の有無、ネットワークモデルの構造の変化については、システム生物学のもう一つの重要な課題であるネットワーク構造推定の分野に属するので言及しない。もう一つの困難な問題は、実験計測データに関するものである。よく指摘される問題は、実験計測において十分な時系列データが得られない場合が多いことである。生体の長時間計測において同一条件を維持することが困難であるという本質的な問題があり、また、生物科学における実験が比較的高価であるという実質的な費用の問題もある。この場合、少数の計測点から動態を解析する手法が要求される。さらに、ネットワークを構成する分子すべてについて計測は必ずしも可能ではない。周知のように、細胞内には多様な分子が存在しそれらの状態をすべて計測できる技術の開発は困難である。また、特にヒトでは倫理的な観点から計測すべきでない細胞及び分子もある。この場合は、非計測の分子を含むネットワークの動態を解析する手法が要求される。

我々は、この問題を克服するための試みとして、代数的アプローチを導入した（図 2(5)-1）。微分方程式モデルから、代数手法の一つである、**Differential Elimination** によって反応パラメータ間の束縛条件を導出し、この束縛条件をパラメータの数値最適化における評価関数の一部に採用した。4 分子の内 1 分子のみが測定可能なネットワークを想定し、そのシミュレーションデータを用いて、束縛条件を考慮する場合としない場合で反応パラメータの最適化を実行した。このとき、最適化の手法として実数値遺伝的アルゴリズムを用いた。その結果、束縛条件を考慮しない場合はパラメータすべてについて正しく推定できなかったが、考慮した場合はすべて推定できた。初歩的な解析ではあるが、**Differential Elimination** による束縛条件を数値最適化における評価関数に導入することは、少数の実験計測データのみからネットワーク動態解析を行うための有用な手法の一つと考えられる。具体的な手法と有効性の検証例を以下に示す。

Differential Algebra は、微分を含む代数に関する理論（各微分が係数体と可換性を有する多元環）である。**Differential Elimination** は **Differential Algebra** の一部であり、**Rosenfeld-Grobner** アルゴリズムの基礎としている。**Differential Elimination** は、入力された微分方程式からなるシステムを、項順序に従って、他のシステムへと書き換える。以下に、**Differential Elimination** の例を示す。

次の式で表される、 x_1, x_2 の二つの変数を持つ微分方程式系を考える。ここで、 k_{12}, k_{21}, k_e, V_e は反応パラメータである。

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= -k_{12}x_1 + k_{21}x_2 - \frac{V_e x_1}{k_e + x_1} \\ \dot{x}_2 &= k_{12}x_1 - k_{21}x_2 \end{aligned} \quad (1)$$

Differential Elimination は、式(1) を、式(2) へと変換する。

$$\begin{aligned} C_1 &= \dot{x}_1(x_1 + k_e)^2 + (k_{12} + k_{21})x_1(x_1 + k_e)^2 + \\ &V_e x_1 k_e + k_{21} V_e x_1(x_1 + k_e) = 0 \\ C_2 &= \dot{x}_1(k_e + x_1) + k_{21}x_1^2 + (k_{12} + V_e)x_1 - \\ &k_{21}(k_e + x_1)x_2 = 0 \end{aligned} \quad (2)$$

式(2)の最初の方程式(C1)は、 x_1 および x_1 の導関数、および反応パラメータのみで構成されており、 x_2 は削除されている。二番目の方程式(C2)は、 x_1 , x_1 の導関数、反応パラメータ、および x_2 で構成されている。 x_1 の時系列データは測定値として与えられており、 x_1 の導関数も x_1 の測定データから数値的に推定することが可能である。また、ネットワークモデル(この例では式(1))と任意の反応パラメータセットが与えられていれば、 x_2 の値も数値的に予測可能である。 x_1 , x_1 の導関数、 x_2 の値を式(2)に代入することによって、反応パラメータのみを含む方程式系を得ることができる。本研究では、これらの方程式系を実数値遺伝的アルゴリズムの評価関数へ導入し、束縛条件として用いる。Differential Elimination に関する全ての代数計算を、MAPLE 10 の `diffalg` パッケージを用いて行った。

一般に、推定された反応パラメータセットを、実験により観測された時系列データに対する再現性という観点から評価する場合、反応パラメータセットからシミュレーションで求めた時系列データと測定データとの間の相対誤差(E)を用いる。すなわち、

$$E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{x_{1,t}^c - x_{1,t}^s}{x_{1,t}^s} \right| \quad (3)$$

ここで、 $xc1,t$ は推定された反応パラメータセットから計算した x_1 の時刻 t におけるシミュレーション値であり、 $xs1,t$ は x_1 の時刻 t における測定値である。一般に、E の値が一定の閾値を下回るように反応パラメータセットを推定する。しかしながら、特に測定データが少ない状況においては、上記の条件を満たす反応パラメータセットが複数存在することにより、正しく反応パラメータセットを推定できないことがある。この問題を克服する一つの方法として、反応パラメータセットの自由度を制限する、新たな束縛条件の導入が考えられる。そこで、本研究では、Differential Elimination によって導出された方程式系を束縛条件 C として実数値遺伝的アルゴリズムの評価関数に導入した。すなわち、

$$\text{ObjectiveFunction} = \alpha E + (1 - \alpha)C \quad (4)$$

ここで、 α は誤差の評価・Differential Elimination から導出した束縛条件の評価についての重み付け係数である。Differential Elimination による束縛条件 C については後述する。

計測不能変数を含むネットワークにおけるパラメータ最適化に関する提案手法の有効性を、4種類の分子で構成されるネットワークモデル(図 2(5)-2)を用いて検証した。(図 2(5)-2)を微分方程式で表現したものを、式(5)に示す。

$$\begin{aligned} \frac{dx_1(t)}{dt} &= k_{21}x_2 + k_{31}x_3 + k_{41}x_4 - k_{e1}x_1(t) \\ \frac{dx_2(t)}{dt} &= -k_{e2}x_2 - k_{21}x_2 \\ \frac{dx_3(t)}{dt} &= -k_{e2}x_3 - k_{31}x_3 \\ \frac{dx_4(t)}{dt} &= -k_{e2}x_4 - k_{41}x_4 \end{aligned} \quad (5)$$

このネットワークモデルでは、 x_1 のみが測定可能であり、 x_2, x_3, x_4 は計測不能な分子であると仮定する。検証を行うためのシミュレーションデータは、各分子の初期値及び反応パラメータを次のように設定して作成した。 $x_1(0) = 10.0, x_2(0) = 130.0, x_3(0) = 80.0, x_4(0) = 170.0, k_{21} = 0.01, k_{31} = 0.1, k_{41} = 10.0, k_{e1} = 5.0, k_{e2} = 3.0$ 求めたシミュレーションデータを図 2(5)-3 に示す。ネットワークモデル(式(5))から、Differential Elimination によって、以下の束縛条件を導出した。

$$\begin{aligned}
C_{1,t} = & \frac{1.0}{k_{21}(k_{21} - k_{31})(k_{21} - k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3} x_1(t) \right) & (6) \\
& + (k_{31} + k_{41} + k_{e1} + 2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) \\
& + (k_{31}k_{41} + k_{31}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + k_{31}k_{e2} \\
& + k_{41}k_{e2} + 2k_{e1}k_{e2} + k_{e2}^2) \frac{d}{dt} x_1(t) \\
& + k_{e1}(k_{31} + k_{e2})(k_{41} + k_{e2})x_1(t) \\
& - k_{21}(k_{21} - k_{31})(k_{21} - k_{41})x_2(t) = 0
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
C_{2,t} = & \frac{1.0}{(k_{21} - k_{31})k_{31}(k_{31} - k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3} x_1(t) \right) & (7) \\
& + (k_{21} + k_{41} + k_{e1} + 2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) \\
& + (k_{41}(k_{e1} + k_{e2}) + k_{21}(k_{41} + k_{e1} + k_{e2}) \\
& + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2})) \frac{d}{dt} x_1(t) \\
& + k_{e1}(k_{21} + k_{e2})(k_{41} + k_{e2})x_1(t) + x_3(t) = 0
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
C_{3,t} = & \frac{1.0}{(k_{21} - k_{41})(k_{31} - k_{41})k_{41}} \left(\frac{d^3}{dt^3} x_1(t) \right) & (8) \\
& + (k_{21} + k_{31} + k_{e1} + 2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) \\
& + (k_{21}k_{31} + k_{21}k_{e1} + k_{31}k_{e1} + k_{21}k_{e2} \\
& + k_{31}k_{e2} + 2k_{e1}k_{e2} + k_{e2}^2) \frac{d}{dt} x_1(t) \\
& + k_{e1}(k_{21} + k_{e2})(k_{31} + k_{e2})x_1(t) \\
& + (k_{21} - k_{41})k_{41}(-k_{31} + k_{41})x_4(t) = 0
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
C_{4,t} = & \frac{d^4}{dt^4} x_1(t) & (9) \\
& + (k_{21} + k_{31} + k_{41} + k_{e1} + 3k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3} x_1(t) \\
& + (k_{21}k_{31} + k_{21}k_{41} + k_{31}k_{41} + k_{21}k_{e1} \\
& + k_{31}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + 2k_{21}k_{e2} + 2k_{31}k_{e2} \\
& + 2k_{41}k_{e2} + 3k_{e1}k_{e2} + 3k_{e2}^2) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) \\
& + (k_{31}(k_{41}(k_{e1} + k_{e2}) + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2})) \\
& + k_{21}(k_{41}(k_{e1} + k_{e2}) + k_{31}(k_{41} + k_{e1} + k_{e2}) \\
& + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2})) + k_{e2}(k_{41}(2k_{e1} + k_{e2}) \\
& + k_{e2}(3k_{e1} + k_{e2}))) \frac{d}{dt} x_1(t) \\
& + k_{e1}(k_{21} + k_{e2})(k_{31} + k_{e2})(k_{41} + k_{e2})x_1(t) = 0
\end{aligned}$$

これらの式のうち、 $C_{4,t}$ は $x_1(t)$ 、 $x_1(t)$ の導関数および反応パラメータのみで構成される方程式である。そのため、 $x_1(t)$ の測定データおよび導関数の値と反応パラメータセットが与えられれば、左辺の値を計算できる。 $C_{1,t}$ 、 $C_{2,t}$ 、 $C_{3,t}$ はそれぞれ $x_2(t)$ 、 $x_3(t)$ 、 $x_4(t)$ を含むが、反応パラメータセットが与えられれば、式(5) から $x_2(t)$ 、 $x_3(t)$ 、 $x_4(t)$ の値を解析的に得られるので、 $C_{4,t}$ と同様に左辺の値を計算できる。

提案手法で使用する評価関数は、計測データと推定値からのシミュレーションデータとの間の誤差を評価する項と、式(6)~(9) で示した方程式の左辺からなる束縛条件の項で構成される。まず、従来の実数値遺伝的アルゴリズムにおける評価関数 OFRCGAs を、計測データと推定値からのシミュレーションデータとの間の誤差として定義する。

$$\text{OFRCGAs} = E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{x_{1,t}^c - x_{1,t}^s}{x_{1,t}^s} \right| \quad (10)$$

続いて、式(6)~(9) の左辺の線形結合を束縛条件として式(11) のように定義する。

$$C_{\text{DE}} = \sum_{l=1}^L \sum_{t=1}^T |C_{l,t}| \quad (11)$$

ここで、 $L=4$ 、サンプリングポイント数 $T=100$ である。最後に、式(11) で示した束縛条件を式(10) の実数値遺伝的アルゴリズムの評価関数に導入したものを、提案手法である記号-数値計算によるパラメータ最適化法の評価関数 OFSN として用いる。

$$\text{OFSN} = \alpha \text{OFRCGAs} + (1 - \alpha) C_{\text{DE}} \quad (12)$$

本研究では、誤差と束縛条件が同等に評価されるように、重み付け係数 $\alpha = 0.99975$ とした。以上の評価関数を最小化できるように、反応パラメータの数値最適化を行う。

図 2(5)-3 に示したシミュレーションデータを使用して、従来の実数値遺伝的アルゴリズムおよび提案手法である記号-数値計算によるパラメータ最適化法それぞれ 200 回ずつ、モデルに含まれる反応パラメータセットのうち、 k_{21} 、 k_{31} 、 k_{41} の推定を行った。その他の反応パラメータ (ke_1 、 ke_2) は最適化の対象外とし、評価関数値の計算では、3.1 においてシミュレーションデータを作成する際に設定した値 ($ke_1 = 5.0$ 、 $ke_2 = 3.0$) を使用した。20,000 回の世代交代の間に平均評価関数値 E/T (T はサンプリングポイント数) が 0.01 を下回った場合を最適化成功とみなしたところ、実数値遺伝的アルゴリズムにおいて 200 回中 132 回、提案手法において 200 回中 90 回の試行が成功した。実数値遺伝的アルゴリズムの方が提案手法と比較して最適化の成功回数が多かったのは、提案手法に導入した束縛条件が反応パラメータセットの最適化に強く影響を与えているからだと考えられる。推定した反応パラメータセットの値のヒストグラムを図 2(5)-4 に示す。図から分かるとおり、我々の提案する記号-数値計算によるパラメータ最適化法は 3 種類全ての係数を正しく推定できた。図 2(5)-4 (a) は k_{21} の値のヒストグラムである。記号-数値計算によるパラメータ最適化法により最大の頻度で推定された k_{21} の値の範囲は $0.005 < k_{21}$ の推定値 ≤ 0.015 である。ここで、 k_{21} の真の値は、シミュレーションデータ(図 2(5)-3) を計算する際に使用した 0.01 であり、真値が最大の頻度で推定された k_{21} の範囲に含まれている。加えて、推定された反応パラメータの値は、真値の近傍に集中している。対照的に、実数値遺伝的アルゴリズムによって推定された k_{21} の値は、0.01~0.05 の範囲に広く分布している。 k_{41} の推定値(図 2(5)-4 (c)) についても、同様の傾向が示された。実数値遺伝的アルゴリズムによって推定された反応パラメータの値が広く分布しているのに対し、記号-数値計算による反応パラメータ最適化法によって推定された k_{41} の値は真値である 10.0 の近傍に集中している。 k_{31} の推定結果(図 2(5)-4 (b)) についても、実数値遺伝的アルゴリズムでは正しい値 ($k_{31} = 0.1$) の推定に失敗したが、記号-数値計算によるパラメータ最適化法では正しく推定できた。まとめると、全ての反応パラメータについて、実数値遺伝的アルゴリズムによる推定値は広く分布していたが、我々の提案手法による推定値は真値の近傍に集中していた。

また、この度解析対象である 3 分子から成る MAPK (mitogen-activated protein kinase) パスウェイの一部とそのリン酸化対象になる転写遺伝子を想定したシミュレーション実験を行った (図 2(5)-5)。同様にシミュレーションデータを生成し (図 2(5)-6)、パラメータ推定を行った。その結果、実数値遺伝的アルゴリズムによる全ての反応パラメータの推定値は広く分布したが、一方我々

の提案手法による推定値は真値の近傍に集中していた (図 2(5)-7)。この結果により、実計測データに関する新規開発技術によるパラメータ推定は、従来法に比べ信頼できる値であることが推測される。

この手法を、MAPK パスウェイにおいてタンパク質阻害剤により計測されたデータにより、細胞増殖因子 (bFGF) の刺激により活性化するパスを同定した (図 2(5)-8)。Elk1 活性化においては、ELK によるリン酸化が主要経路であり JNK の約 1.5 倍、p38 の約 2.5 倍の相互作用強度を示すことを推定した。一方、従来の遺伝的アルゴリズムでは信頼に足る結果を得ることができなかった。この結果は、新規開発法の有効性を示すと共に、ELK が主要経路であることは従来の見解と一致する点はもちろんであるが、生きた細胞内で相互作用強度の定量的な推定に成功したのは世界で初めてである。

2-6 新規開発法のソフトウェア化（産総研 CBRC）

微弱蛍光細胞時系列画像データの数值化ソフトウェアとして、「超微蛍光レポータ遺伝子画像解析システム」（図 2(3)-1 A～J 参照）、また、数值化を含む数理解析を実装したソフトウェアとして、「細胞アレイによる主要パス高精度同定システム」を作成した（図 2(6)-1）。特に後者は、数理解析に不案内な利用者の利便性を考慮して、KNIME (<http://www.knime.org/>) によって可視化と各解析段階のコンパートメント化を実現した。これらのソフトウェアは、コンピュータの OS に依存せず通常のパーソナルコンピュータで容易に実装可能であり、本新規開発技術の配布による提供が容易である。

2-7 パスウェイの理論的解析手法開発 (京都大学)

2-7-1 定常状態検出アルゴリズム

ブーリアンネットワークは図 2(7)-1 (A) (B) に示すように、個々のノードが 0 (遺伝子が発現している) か 1 (遺伝子が発現していない) のいずれかの状態 (ブール値) をとり、(個々の頂点に対して) ブール関数の形式で与えられた制御規則に従い頂点の状態が同期して変化するという遺伝子ネットワークの数理モデルであり、1960 年代から研究されている基礎的なモデルである。ブーリアンネットワークの大域的なダイナミクスは図 2(7)-1 (B) に示す状態遷移表により記述でき、さらに、その表は図 2(7)-1 (C) に示す状態遷移ダイアグラムで表すことができる。状態遷移ダイアグラムにおいて自分自身にループがあるノードは (静的な) 定常状態に対応する。なお、定常状態は異なる細胞の種類に対応すると考えられている。よって、ネットワークが与えられた時に全ての定常状態を計算すれば、対応する生物 (のゲノム) から、どのような細胞が生成可能かを知る上で有用な情報が得られることになる。もちろん、図 2(7)-1 (C) のダイアグラムを作成すれば定常状態を簡単に検出できるが、ノード数 (遺伝子数) を n とすると状態遷移ダイアグラムは 2^n 個の節点を持つため、その手法を大きな n に対して適用することは不可能である。ネットワークに何も制約がない場合には、 2^n の壁を破るのは困難であると考えられるが、本プロジェクトにおいては、いくつかの妥当な制約のもとで、この 2^n の壁を破ることに成功した。その成果は大きく 2 種類にわかれるので、以下、別々に示す。

(1-1) 入次数限定の場合

入次数が K 以下の場合の定常状態検出問題が論理式充足可能性問題 (SAT) とよばれる理論計算機科学における重要で基礎的な問題に変換できることを示した。例えば v_1 という遺伝子が v_2 と v_3 の AND で制御されているとする。つまり、時刻 t において v_2 と v_3 の両方が 1 (発現している) の時のみ時刻 $t+1$ で v_1 が 1 になり、それ以外の場合には時刻 $t+1$ で v_1 が 0 (発現していない) になるものとする。定常状態検出問題においては、この制御規則は図 2(7)-2 に示す積和標準形とよばれる形式の論理式に変換される。このように変換自体は比較的単純であるが、この変換により $K=2$ の場合には $O(1.323^n)$ 時間、 $K=3$ の場合には $O(1.474^n)$ 時間、 $K=4$ の場合には $O(1.569^n)$ というように、 $O(2^n)$ 時間より理論的に大幅な高速化を達成することができた。このことは情報科学の理論的観点から意義があるだけでなく、SAT-solver というソフトを利用することにより定常状態検出が高速に行える可能性を示しており、実際の定常状態計算という観点からも意義がある。さらに、 $K=2$ の場合の上記の計算時間はより正確には $O(1.32216^n)$ 時間となるが、いくつかの工夫を行うことにより $O(1.322159^n)$ 時間とできることを示した。ほんの僅かな改善ではあるが、単純な手法より良い手法が存在することを示したことに大きな情報科学的意義がある。

(1-2) AND/OR ネットワークの場合

ブール関数の形式がリテラル (変数かその否定) の論理和もしくは論理積に制約された場合、すなわち、ブール関数が NOT つきの AND/OR に限定された場合に対して定常状態検出を行う $O(1.757^n)$ 時間アルゴリズムを開発した。このアルゴリズムは遺伝子 w が AND 頂点であり遺伝子 v がその入力の一つとなっている場合には、 $(v,w)=(0,0),(0,1),(1,0),(1,1)$ の 4 種類の関係のうち、 $(0,1)$ はあり得ない (定常状態の条件を満たさない) ので、無駄な探索を削除できるというアイデアに基づいている。さらに、この制約に加え、ネットワークに交差する枝がない場合に対する $O((1+\varepsilon)^n)$ 時間アルゴリズムも開発した (ε は任意の正数)。実際の遺伝子ネットワークのブールモデルにおける多くの制御規則は NOT つきの AND/OR、もしくは、それらを少数組み合わせさせた論理関数で表現できると考えられるので、これらの理論的成果は情報科学的観点からは大きく意義のある成果となっている。

2-7-2 代謝ネットワークの頑健性解析

代謝ネットワークは、化合物を論理和 (OR) ノード、化学反応を論理積 (AND) ノードと対応させることによりブーリアンネットワークとしてモデル化することができる。なお、このようにモデル化する理由は、化合物はいくつかの反応のうち一つでも有効であれば生成できるが、化学反応は一種類でも入力化合物が欠けると反応が進まないからである。ここで目標化合物が与えられた時に、目標化合物を生成不能とするために不活性化 (ノックアウト) しなくてはならない反応数 (≡酵素数≡遺伝子数) を頑健性として定義し、与えられた代謝ネットワーク形状から頑健性、および、その最小数の反応の組み合わせを計算する問題を頑健性解析問題として定義した (図 2(7)-3 および図 2(7)-4 参照)。この問題は複数の薬剤を与えて治療を行う場合のターゲット探索に役立つ可能性がある。まず、この問題の計算複雑度に関する理論的研究を行い、この問題が計算困難 (NP 困難) なクラスに属することを示した。次に、NP 困難な問題を解く際に有効な手法である整数計画法を用いた方法を開発し、計算機実験を行った。その結果、反応数が 100 以上の規模のネットワークに対して数秒程度で頑健性を計算することができた。

具体的な例として、KEGG データベースより取得した Glycolysis, Citrate cycle (TCA cycle), Pentose phosphate pathway を合わせた経路を利用し、表 2(7)-1 に示した 5 種類の化合物それぞれについて、対象化合物を生成不可能とするために同時に不活性化することが必要な最小の反応 (≡酵素) 数を計算した。さらに、これら 5 種類の化合物を同時に生成不可能とするために不活性化することが必要な最小の反応数も計算した。その結果は表 2(7)-1 のとおりとなった。なお、モデルを立てる場合の仮定として、外部由来の有機、無機の代謝物はいくらでも利用可能とした。表 2(7)-1 の結果は、高等な生物になるほど経路が複雑になりバイパスが増え、頑健性が増すことを示唆している。ただし、ヒトと大腸菌が似たような頑健性を示している点が例外的であるが、その理由として、ヒトは反応の数が多いにも拘らず解糖系 (ピルビン酸の合成など) に関して EM 経路しか持っていないが、大腸菌は EM 経路と ED 経路を持っていることが考えられる。

2-7-3 ネットワーク補完

ネットワーク補完は、図 2(7)-5 に示すように、既知の (不完全な) ネットワークと実験データが与えられた時に、既知のネットワークに最小限の修正をほどこすことにより実験データとの整合性をとるという問題である。ネットワーク補完は本プロジェクトを進めていく過程で生まれた新たな概念であり、本研究ではブーリアンネットワークによる定式化とその計算理論的解析、および、最小二乗法を用いた実用指向のアルゴリズム開発という二種類の成果を得た。以下、それぞれの成果を個別に示す。

2-7-3-1 ネットワーク補完の理論的解析

理論的な観点からはネットワーク補完をループのないブーリアンネットワークを用いて定式化し、その計算量を解析した。具体的には、観測できるのは少数のタンパク質 (もしくは遺伝子) の発現量だけとし、外部刺激を様々に変化した際に観測結果と、もとなるネットワークを入力として与え、観測結果と現在のネットワークに整合性がとれない場合に、頂点に割り当てられたブール関数を変更する (もしくは最初の時点でのブール関数かが不明であった場合には、新たにブール関数を割り当てる) ことにより整合性をとる問題として定式化した。なお、変更を行う頂点の個数は最小であるものとした。具体的な例として、シグナル伝達ネットワークを対象とした概念的な図 2(7)-6 を考える。ここで MEKK1,JNK,MKK7 にはどのようなブール関数 (制御規則) が割り当てられているか、当初は不明であるものと仮定する。ここで、TRAIL=1, Cdc42/Rac=0, CASP=0 という外部刺激が加わった時に、c-JUN=1 となったとする。すると、AND か OR の規則のみが許される場合には、MEKK1,JNK,MKK7 には図に示したブール関数が割り当てられなくて

はいけないことがわかる。これがネットワーク補完の例である。このように定式化した問題について理論的解析を行った結果、この問題が理論的観点からは計算困難（NP 困難）であることを示すことができた。一方、ネットワークが部分 k 木という木構造に似た形状を持つ場合で、かつ、少数の実験データのみが与えられた場合には理論的には効率良く（多項式時間で）解けるという理論的成果を得た。

理論的成果に加え、このブーリアンネットワークを用いたモデルのもとで整数計画法を用いたアルゴリズムを開発した。整数計画法は、指定された変数のグループが整数値をとらないといけないという制約のもとで、線形計画法（連立一次不等式のもとで、線形関数（一次関数）の値を最大化（もしくは最小化）する）を実行する問題であり、多くの計算困難な問題の解決に幅広く利用される方法論・ソフトウェアである。この整数制約を用いることによりブール関数を一次不等式を用いて表現することができる。その性質を利用することにより、ブーリアンネットワークのもとでネットワーク補完問題を解く手法を開発することができた。具体的な実行例として図 2(7)-7 の右上に示すような観測データが与えられたと仮定した場合に、図 2(7)-7 に示す 2 種類の変更を加えることにより観測データと合致することができるという結果が得られた。しかしながら、整数計画法を用いた手法はネットワークの規模が小さく、かつ、観測データの個数が少ない場合には適用可能であるが、それ以外の場合には計算時間が膨大になってしまうという問題がある。そこで、より実用的な最小二乗法に基づく手法を開発した。

2-7-3-2 最小二乗法に基づくネットワーク補完

ブーリアンネットワークでは発現量を 0, 1 に丸めなくてははいけないため、実際のデータ解析には適用しにくいという問題点があった。さらに、整数計画法を用いた補完アルゴリズムでは大規模なネットワークやデータに対応できないという問題点があった。これらの問題点を解決するために、制御規則をブール関数で表現するのではなく、一次式や二次式の線形和で表現する方法を採用した。具体的には、タンパク質 x がタンパク質 y と z に制御されているとすると、それらの関係を以下の式で表現する。

$$x = a_1y + a_2z + a_3yz + a_4 + \varepsilon$$

ここで、 ε は（観測不能な）ノイズを表し、 a_i はパラメータを表すものとする。また、右辺の最初の二項は OR の効果を三番目の項は AND の効果を表している。複数の観測値 x_i, y_i, z_i が与えられれば、実際の観測値と上の式で計算した値ができるだけ合致する（二乗誤差が最小となる）ようなパラメータは最小二乗法により計算することができる。

ここで、ブーリアンネットワークの場合とは異なり、（ほとんど）すべてのタンパク質の発現量が観測可能であると仮定する。そして、ネットワークの形状を変化させた方が二乗誤差が少なくなる場合には変化させることにする。形状の変化、すなわち、局所的なネットワークの補完には様々な方法が考えられるが現時点では、図 2(7)-8 に示すように

- ・頂点のバイパス（対応するタンパク質の発現量のノイズが多すぎて観測量に意味がない場合）
- ・現在の入力に加え、他の 1 個のタンパク質からの辺（新たな制御関係）を追加

の 2 種類を考慮している。そして、頂点ごとに可能な補完を全て試して、最も実験データとの誤差が少なくなる補完結果を採用するようにしている。

このアルゴリズムを、Karen Sachs らによる実際のタンパク質発現データ (K. Sachs et al.: Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data, Science, 308:523529, 2005) を用いて、シグナル伝達ネットワークの補完に適用した。Sachs らは 11 種類のタンパク質に対するデータを公開しているが、現在の補完アルゴリズムはループがある部分への対応が完全ではないので、ループを構成する 3 種類のタンパク質を除いた 8 種類のタンパク質からなるネットワークに

適用した。図 2(7)-9 の左図が Sachs らの論文で既知のシグナル伝達ネットワークとされているものである。Sachs らのタンパク質発現データを用いてこのネットワークを補完した結果が図 2(7)-9 の右図である。もとのネットワークに対し、ネットワーク補完により 6 種類の新たな辺（制御）が追加されたことがわかる。Sachs らが（補完ではなく）推定した結果と比較すると、赤色の線は妥当な補完結果であり、青色の線は妥当かどうか不明で今後の検証が必要な補完結果となっている。

ネットワーク補完は本プロジェクトの後半に新たに提案した概念でありアルゴリズムが十分に改良されるには至っていないが、上記の結果はこの概念や手法の有用性を示唆するものとなっている。今後、改良を進めるに従い、ネットワーク補完はネットワークの推定や解析の有用な方法論となることが期待できる。

2-8 染色体変化による遺伝子発現の評価（山口大学、産総研 RICE（つくば）平野氏グループ）

多くのがんにおいて、がん細胞はさまざまな染色体異常を有している。しかし、そのメカニズムは未だ解明されていない。このほとんどのがん細胞で見られる染色体異常は、染色体そのものの数の異常や、ある遺伝子領域におけるDNA コピー数の増幅や減少（欠失）、非遺伝子領域におけるDNA コピー数の増幅や減少（欠失）である。実際、多くのがん細胞で様々ながん遺伝子領域のDNA コピー数の増幅や、がん抑制遺伝子領域のDNA コピー数の減少（欠失）など、がん細胞におけるDNA コピー数の異常が報告されている。1992年にKallioniemiらによって報告されたComparative Genomic Hybridization (CGH) 法は、それまでのFluorescent in situ Hybridization (FISH) 法を応用した手法で、1度の処理で全ゲノムにおける染色体上のDNA コピー数増幅領域や欠失領域を網羅的に解析することが可能であり、様々ながんで特徴的な染色体異常領域が特定されるようになった。しかし染色体CGH法は、その対象が染色体であるため、10MB以下の小さな異常領域の検出は、原理的に困難とされていた。その後、mRNAを用いたMicro Arrayが開発され、次いで発現解析のためのDNA Arrayが開発された。しかしDNA Arrayは、cDNAやcDNAを基にした数十塩基のオリゴヌクレオチドをスライドガラス等にスポットしているため、近年その重要性が注目されている、イントロンやマイクロサテライト等の反復配列を含めた非遺伝子領域の検討が不可能であった。

2001年にヒトゲノムの解読が大まかにではあるが終了した。ヒトDNAの全塩基配列が明らかとなったことから、ヒトゲノム全体を網羅するBacterial Artificial Chromosome (BAC)を用いたBAC Array CGH法が開発された。BACには、従来のarrayでも搭載されていた遺伝子領域だけでなく、これまで解析が不可能であったイントロンや反復配列といった非遺伝子領域も含まれていることから、全ゲノムをより網羅的に解析することが可能となった。

プロジェクト前期において、全ゲノムを網羅したBAC arrayを用い、BAC array CGH法による解析を行った。それにより、乳がん細胞に特徴的な遺伝子変異を含めたDNA コピー数の異常を検出し、乳がんにおける創薬のターゲットになりうる候補遺伝子の検索を行った。その成果として、乳がん細胞株24株を解析し、8q24.13 (ZHX2)や8q24.21 (Myc)、2q37.2 (CENTG2)、13q12.2 (IPF1)を含む218クロソンの領域において、335遺伝子の高頻度なDNA コピー数異常を見出した。

プロジェクト後期では、樹立された細胞株と外科的切除されたがん組織とのゲノム異常を調べた。更に、外科的に切除された乳がん組織に対し、BAC CGHアレイを用い染色体異常を調べ乳がんの診断と治療に有用な情報を探索した。

2-8-1 細胞株と乳がん組織間のゲノム異常の検出

樹立継代された細胞株は元の組織での特性を反映しているものとしてがんの研究を含めて種々の研究に汎用されている。しかし、細胞株と組織との間での異同についての情報はほとんど無い。細胞株にて、本来の組織と異なった genotype あるいは phenotype が存在するとすれば、in vitro モデルの使用には注意を要することになる。ここでは乳がん細胞株と外科的切除されたがん組織とのゲノム異常をアレイ CGH (aCGH) によって解析し、ゲノム異常の異同について検討した。

用いた細胞株は以下の24株：AU565, HCC2218, T-47D, HCC1954, MDAMB361, UACC812, UACC893, BT474, SKBR3, HCC38, HCC1008, ZR-75-30, HCC1937, MDAMB468, HCC1428, ZR-75-1, MCF7, MDAMB231, BT483, HCC1806, Hs578T, MDAMB175VII, MDAMB415である。一方、がん組織としては35例の浸潤性乳管がんを対象とした(所定の倫理委員会の承認と患者からの同意書を得た)。DNAを抽出するための材料としては、短時間のアルコール固定、パラフィン包埋切片を作製した。そこからDNAを抽出するがん細胞を採取するが、正常細胞の混入をできるだけ少なくするために、tissue microdissectionにより、がん細胞のみを採取するようにした。

1) 方法

DNA 抽出

高分子 DNA を DNA 抽出キット (SepaGene, Sankojyunyaku Co) を用いて型通りに抽出した。

アレイ CGH

356 種類のがん関連遺伝子を含む 4030 種類の BAC クローンをスポットしたアレイ (Macrogen 社) を用いて、アレイ CGH を行った。なお、当該アレイについての情報は以下 (http://www.macrogen.co.kr/eng/biochip/karyo_summary.jsp) で得ることができる。アレイ CGH の方法の概要は以下のとおりである。すなわち、対象 DNA は全例女性 DNA (Promega, Madison, WI) を使い、ランダムプライマー標識キット (BioPrine[®] DNA Labeling System, Invitrogen[™]) を利用して Cy3 にて蛍光標識 (PerkinElmer Life Science, Inc.) を行った。一方、検体である腫瘍 DNA を対照 DNA の場合と同様に Cy 5 (PerkinElmer Life Science, Inc.) にて標識し、両者を Cot-1 DNA (50 mg, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) の存在下に混合し、通常の手順どおりにエタノール沈殿後、ハイブリダイゼーション液を作成した。このプローブ混合液を 75°C で 5 分間処理することにより、DNA を変性させた。さけの DNA で予め処理したアレイに載せて 37°C で 3 日間ハイブリダイゼーションを行った。その後、50% formamide/2xSSC、45°C にてアレイを洗浄した。

アレイ画像の取込みには、GenePix 4000A スキャナー (Axon Instruments, Union City, CA) にてスライドを走査し、アレイ画像を取込み専用の解析ソフト (GenePix Pro 5.0 software) を用いて実施した。蛍光画像の解析は、専用ソフトの MAC Viewer[™] software program (Macrogen Inc.) を用いて行った。Cy3 と Cy5 との蛍光強度比は \log_2 として表示し、 ± 0.25 をコピー数増加、減少とし、1.0 以上を増幅として扱った。

統計処理は、臨床病理学的事項とコピー数変化との関係をクローン一つひとつについて検討し、Student *t*-test, Welch's *t*-test or nonparametric Mann-Whitney's U テストを用い、P 値が 0.05 以下を有意とした。

2) 結果と考察

乳がん細胞株では、乳がん組織と比較して、DNA コピー数異常部位は細胞株において組織の 1.7 倍の異常箇所がみられた (図 2(8)-1)。図 2(8)-2 と図 2(8)-3 に示すように、細胞株では、コピー数増加部位として、1q, 5p, 8q, 20q で、減少として 1p, 3p, 4p, 6p, 8p, 9p, 10q, 11p, 13q, 15q, 17p, 18q, X で高頻度にみられた (細胞株の 50% 以上)。一方、組織では、増加が 1q, 8q で、減少は 8p 11q, 16q, 17p で見られた (症例の 50% 以上)。5p と 20q でのコピー数増加、1p, 3p, 4p, 6p, 9p, 10q, 13q, 15q, 18q, X でのコピー数減少は細胞株で目立っていた。4030 クローンについて、コピー数異常の頻度を細胞株と組織で比較すると、20q13 と 5p15 とにあるクローンのコピー数増加は細胞株では高頻度 (最大で 83%) に見られたが、組織では極めて稀 (3% 以下) であった。例えば、20q13.1 と 20q13.33 にあるクローンのコピー数増加は細胞株の 75% にみられたが、組織では 3% 程度の症例に見られたにすぎなかった ($P=5.68 \times 10^{-9}$, and $P=1.23 \times 10^{-8}$) (図 2(8)-3)。また、Xp11.3 のコピー数減少は細胞株の 87.5% で見られたが、組織では 1 例に認められたにすぎなかった ($P=3.99 \times 10^{-11}$)。一方、1q と 8q とでのコピー数増加と 11q と 17p とでのコピー数減少は細胞株、組織の両者に高頻度で認められた (図 2(8)-2、Table 1, 2, 3, 4, 5)。

以上から細胞株と手術で採取された組織から直接解析した aCGH の結果には大きな差異があることが明らかになった。それには幾つかの要因が考えられる。In vitro の環境で、がんの特性である genetic instability によって、次々とゲノムに異常がもたらされる結果、細胞株と組織では大きな差異が見られるようになるとする仮説は受け入れやすい。In vitro では常時ゲノムに変化を生じる

ことはよく知られている。細胞株と組織との間でゲノムに差異をもたらす機序はともかくとしても、両者に共通する変化と細胞株にのみ見られる変化がある。細胞株を研究に利用する場合には、この点に配慮することが必要である。

3) 発表論文

Tsuji K, Kawauchi S, Saito S, Furuya T, kemoto K, Nakao M, Yamamoto S, Oka M, Hirano T, Sasaki K. Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: Comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues *BMC Cancer* 2010, 10:15 (14 January 2010)

Table 1 細胞株と乳がん組織間でコピー数増加に差異が存在した BAC クローン

Chromosomal Region	Candidate genes	Frrequency (%)		P-value
		Cell lines	Tissue	
20q13.33	ZGPAT, BTBD4,	18 / 24	1 / 35	5.68551E-09
20q13.13	COX6CP2	18 / 24	1 / 33	1.26370E-08
2q22.3		16 / 24	0 / 34	2.20899E-08
20q13.31	TFAP2C, PTMAP6	20 / 24	6 / 35	4.89015E-07
7p22.3	FLJ20397, UNC84A,	14 / 24	1 / 35	1.52990E-06
20q13.12	MYBL2	14 / 24	1 / 35	1.52990E-06
20q13.12	ADA, WISP2	14 / 24	2 / 35	7.97121E-06
20q11.21	DNMT3B, MAPRE1	11 / 24	0 / 35	8.97575E-06
20q11.21-20q11.22	SNTA1	11 / 24	0 / 35	8.97575E-06
8q24.3	HSF1, DGAT1, SCRT1	17 / 24	5 / 35	1.02265E-05
20q13.33	TPD52L2, DNAJC5	17 / 24	5 / 35	1.02265E-05
3q29	LRCH3, IQCG,	12 / 24	1 / 35	1.77298E-05
20p13	DEFB32, TRIB3	12 / 24	1 / 35	1.77298E-05
20q13.33	ARFGAP1, CHRNA4	19 / 24	8 / 35	2.00152E-05
5p14.1		13 / 24	2 / 35	2.68521E-05
11q13.3-11q13.4	PPFIA1, CTTN, SHANK2	13 / 24	2 / 35	2.68521E-05
20q11.21	BCL2L1, TPX2, MYLK2	13 / 24	2 / 35	2.68521E-05
20q13.33	KCNQ2, EEF1A2, PTK6,	17 / 24	6 / 35	3.26970E-05
5p15.31		15 / 24	4 / 35	3.72069E-05
5p15.2	MARCH6	15 / 24	4 / 35	3.72069E-05
5p15.1	BASP1, FTHL10	15 / 24	4 / 35	3.72069E-05
6q22.31		16 / 24	4 / 31	3.94622E-05
8q24.21	MYC, PVT1,	22 / 24	14 / 35	6.40836E-05
7q11.23	POR, TMPIT, DUSP24	9 / 24	0 / 35	8.30527E-05
14q22.2-14q22.3	GALIG, LGALS3 DLG7	9 / 24	0 / 35	8.30527E-05
19q13.43	ZNF544, ZNF8, HKR2	9 / 24	0 / 35	8.30527E-05
20p11.23	ZNF339, RPL15P1	9 / 24	0 / 35	8.30527E-05
3q29	TMEM44, FLJ11301	12 / 24	2 / 35	8.56953E-05
10p15.3	GTPBP4, IDI2, IDI1	12 / 24	2 / 35	8.56953E-05
20p13	CSNK2A1	12 / 24	2 / 35	8.56953E-05
20q13.2	ZNF217	17 / 24	7 / 35	9.43882E-05

Table 2. 細胞株と乳がん組織間でコピー数減少に差異が存在した BAC クローン

Chromosomal Region	Candidate genes	Frrequency (%)		P-value
		Cell lines	Tissue	
Xp11.3	UTX	21 / 24	1 / 35	3.98705E-11
Xq27.1	-	16 / 24	0 / 35	1.52947E-08
Xq21.1	-	18 / 24	2 / 35	3.33574E-08
4p15.1	-	16 / 24	1 / 35	1.05951E-07
4p13	-	14 / 24	0 / 34	3.16890E-07
18q12.3	RIT2	16 / 23	2 / 34	3.88478E-07
Xq26.2	OR2AF1	15 / 24	1 / 35	4.14685E-07
Xq27.3	HCP44	15 / 24	1 / 35	4.14685E-07
18q21.1	MAPK4	18 / 24	4 / 35	7.03535E-07
Xq28	F8, VBP1, RAB39B, CLIC2 PHF10P1	13 / 24	0 / 35	8.17519E-07
18q21.1	KIAA0427	17 / 24	3 / 34	9.90978E-07
8p12	WRN	18 / 24	4 / 34	1.01721E-06
2q34	SPAG16	13 / 24	0 / 34	1.10437E-06
Xq26.2	GPC3	14 / 24	1 / 35	1.52990E-06
4p16.3	FLJ35816	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
4p15.1	-	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
18q12.2	-	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
Xq28	SLC14A2, SLC14A1	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
18q21.1	KIAA0427	17 / 24	3 / 34	9.90978E-07
8p12	WRN	18 / 24	4 / 34	1.01721E-06
2q34	SPAG16	13 / 24	0 / 34	1.10437E-06
Xq26.2	GPC3	14 / 24	1 / 35	1.52990E-06
4p16.3	FLJ35816	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
4p15.1	-	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
18q12.2	-	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
18q12.3	SLC14A2, SLC14A1	15 / 24	2 / 35	2.23384E-06
4p15.1	-	17 / 24	4 / 34	4.02576E-06
18q21.32	-	17 / 24	4 / 34	4.02576E-06
Xq28	CSAG2, MAGEA2B MAGEA12, CSAG1	14 / 23	2 / 35	4.27750E-06
4q13.1	EPHA5	8 / 16	0 / 35	5.21729E-06
3p22.1	NKTR, ZNF651, KBTBD5	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06
4p16.3	HD,	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06
4p13	-	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06
4q22.1	-	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06
5q14.3	-	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06
18q12.1	-	13 / 24	1 / 35	5.34274E-06

Table 3. 細胞株と乳がん組織に共通してコピー数増加がみられた BAC クローン

Chromosomal Region	Genes	Frequency		P-value
		Cell lines	Tissue	
1q44	FLJ10157	13 / 24	19 / 35	0.992806112
8q22.1	TSPYL5	15 / 24	22 / 35	0.977767962
8q21.3	NBS1, DECR1	14 / 24	20 / 35	0.927569885
8q23.1	MGC35555	14 / 24	20 / 35	0.927569885
1q21.1	-	12 / 24	18 / 35	0.914136773
1q21.2-1q21.3	PIP5K1A, PSMD4, KIAA1441	12 / 24	18 / 35	0.914136773
1q23.1	SH2D2A, INSR, NTRK1	12 / 24	18 / 35	0.914136773
1q32.1	MDM4	12 / 24	18 / 35	0.914136773
1q42.11	CAPN2, TP53BP2	12 / 24	17 / 35	0.914136773
1q44	FLJ32001, CGI-49	12 / 24	17 / 35	0.914136773
1q44	OR1C1, OR9H1P, OR11L1	12 / 24	18 / 35	0.914136773
7p14.1	TRGJP2, TRGC1, TRGJ1	12 / 24	18 / 35	0.914136773
7p14.1	TRGJP1, TRGV11, TRGVB	12 / 24	17 / 35	0.914136773
8q24.22	-	12 / 24	17 / 35	0.914136773
17q25.3	TBCD	12 / 24	17 / 35	0.914136773
1q25.1	TNN, KIAA0040	14 / 24	21 / 35	0.898133861
8q21.3	NBS1	14 / 24	18 / 35	0.898133861
8q22.2	KCNS2, STK3	14 / 24	18 / 35	0.898133861

Table 4. 細胞株と乳がん組織に共通してコピー数増加がみられた BAC クローン

Chromosomal Region	Genes	Frequency (%)		P-value
		Cell lines	Tissue	
17p11.2	DRG2, MYO15A, LLGL1, FLII	13 / 24	19 / 35	0.992806112
17p12	LOC388338, HS3ST3B1	15 / 24	22 / 35	0.977767962
11q23.2	ZBTB16	12 / 24	18 / 35	0.914136773
11q25	SPAS1	12 / 24	18 / 35	0.914136773
17p13.3	NXN	12 / 24	17 / 35	0.914136773
17p13.1	ASGR1, DLG4, ACADVL	14 / 24	21 / 35	0.898133861
17p13.1	MYH3, SCO1, MDS006	14 / 24	19 / 34	0.852726956

Table 5 コピー数増幅を呈する BAC クローン

Chromosomal region	Candidate genes	No, of tumors	Frequency (%)
<u>Cell lines (n=24)</u>			
17q12	NEUROD2, PPP1R1B, STARD3, TCAP, PNMT, PERLD1	10	41.7
17q12	PERLD1, ERBB2 , GRB7, ZNFN1A3	10	41.7
17q21.1	ZNFN1A3, ZBP2, GSDML, ORMDL3, GSDM1, PSMD3	8	33.3
8q24.13	ZHX2	7	29.2
5p15.33	TPPP, LOC442127, ZDHHC11	6	25.0
8q24.12	SAMD12	6	25.0
8q24.12	MRPL13, MTBP, SNTB1	6	20.5
8q24.22	TG,	6	25.0
20q13.2	BCAS1, CYP24A1	6	25.0
20q13.2	BCAS1	6	25.0
20q13.2	DOK5	6	25.0
20q13.2	DOK5	6	25.0
20q13.32	PCK1, ZBP1, TMEPAI,	6	25.0
<u>Tumor tissues (n=35)</u>			
17q12	NEUROD2, PPP1R1B, STARD3, TCAP, PNMT, PERLD1	7	20.0
17q12	PERLD1, ERBB2 , GRB7, ZNFN1A3	8	17.1
17q21.1	ZNFN1A3, ZBP2, GSDML, ORMDL3, GSDM1, PSMD3	6	17.7
8p12	-	5	14.3
8q21.11	PI15	5	14.3
8q21.11	ZFHX4	5	14.3
8q24.21	DDEF1	5	14.3
17q23.3	TEX2	5	14.3
8p12	WHSC1L1, LETM2, FGFR1	4	11.4
8p12-8p11.23	LETM2, FGFR1	4	11.4
8p11.23	TACC1, PLEKHA2	4	11.4
8q21.11	-	4	11.4
8q21.12	IL7	4	11.4
8q21.3	RUNX1T1	4	11.4
8q22.1	-	4	11.4
8q22.3	-	4	11.4
8q23.3	-	4	11.4
8q24.11	-	4	11.4
8q24.13	-	4	11.4
17q23.3	CSH1, CSHL1, GH1, CD79B, SCN4A	4	11.4

2-8-2 乳がん組織のゲノム異常の検出

乳がんは組織学的にも生物学的にも不均一な腫瘍であり、遺伝子型と表現型との関係も明らかにされていない。それを解決する第一歩としてアレイ CGH (comparative genomic hybridization)を用いたゲノムの網羅的解析によるコピー数異常(DCNA)とホルモン受容体発現、HER2 増幅とを対比することにより、ホルモン受容体発現、HER2 増幅と関連するゲノム異常の同定を試みた。

1) 方法

前出 2-8-1 項の方法に同じ

2) 結果と考察

1q23-q44 の広い範囲でコピー数の増加を呈しており、特に 1q32.1 のコピー数増加は 78.3% (36 例)で認められた。また、8q23.2 でのコピー数増加も 30 例 (66.7%)に見られた。コピー数減少は 8p23.1 と 8p23.3 とで、それぞれ 37 (80.4%)、28 例 (60.9%)に認められた。

検討した乳がん 46 例のうち、37 例がエストロゲン受容体(ER)を発現しており、28 例でプロゲステロン受容体 (PgR) が発現していた。1p13.2 と 1p32.3 とのコピー数増加は ER-/PgR-乳がんのみ認められ、2p25.3 や 10p11.22 のコピー数増加や 16p11.2 の減少も ER-/PgR-乳がん全例で見られた。12q15 のコピー数減少は いわゆる triple-negative 症例でのみ認められた。ここ 12q15 に含まれる BAC クローンには A 遺伝子が存在している (図 2(8)-4)。実際、免疫組織化学的には、これらの乳がんには A 遺伝子の発現は陰性であった (図 2(8)-5)。

当該 12q15 コピー数の変化のない乳がん細胞株 MCF7 とコピー数減少を呈する乳がん細胞株 MDAMB468 における A 遺伝子産物の増殖に対する影響を比較した。

MCF7 では A 遺伝子産物の添加によって細胞増殖には影響は見られなかった。一方、MDAMB468 では細胞増殖は大きく抑制された (図 2(8)-6)。このことは、治療法が無いといわれる triple-negative 乳がんの治療に新しい途を開くものと期待される。

乳がんにおけるコピー数増加と減少を呈するクローン

Copy number gain			Copy number Loss		
Clone ID	Chromosome Resion	Frequency (%)	Clone ID	Chromosome Region	Frequency (%)
2893	1q32.1	78.3	4589	8p23.1	80.4
2316	1q23.3	76.1	5579	8p23.3	60.9
4752	1q32.1	76.1	923	8p23.3	58.7
1365	1q42.12	76.1	1601	16q21	58.7
1038	1q25.2	73.9	613	17p13.1	56.5
4527	1q41	73.9	2226	17p12	56.5
1078	1q32.3	71.7	5831	8p23.3	54.3
5826	1q44	71.7	2868	16q22.1	54.3
1344	1q25.3	69.6	965	16q22.3	54.3
2715	1q32.1	69.6	1070	16q23.1	54.3
4483	1q32.2	69.6	4128	16q24.2	54.3
4819	1q41	69.6	1146	16q24.3	54.3
2271	1q32.1	68.9	5652	17p13.3	54.3
2520	1q32.1	67.4	5643	8p23.3	52.2

2197	1q44	67.4	4916	13q21.1	53.5
1394	8q23.3	66.7	1142	16q21	53.3
1412	1q23.2	65.2	2281	16q24.1	52.2
4858	1q42.13	65.2	5816	16q24.3	52.2
4710	1q42.2	65.2	1536	17p13.1	53.3
5559	1q44	65.2	1597	17p11.2	52.2

【本プロジェクトで利用した array-based CGH(comparative genomic hybridization)のプロトコル(山口大学版)】(BAC アレイ (bacterial artificial chromosome spotted array)を用いたアレイ CGH)

我々の施設では、約 4300 の BAC クローン を Macrogen 社の BAC アレイ(C チップタイプ)を利用している。アレイキットとして販売されており、アレイとともに必要な試薬も提供されており、添付された手順書に従えば、問題なく実施できる。

1) ゲノム DNA の精製

RNA やタンパク質を除去できる一般的な方法で精製する。キットが便利である。

2) プローブのラベル化

ランダムプライムラベリング (Invitrogen Kit) キットによる

テスト DNA 及び対照 DNA の標識

①4 本の 0.5ml チューブを用意し各チューブ内に以下を入れる。

テスト DNA 及び対照 DNA を各 0.5 μ g

Nuclease-free 水を加えて 21 μ l に

ランダムプライマー溶液 20 μ l

軽くタッピングしスピンドウン

(注 壁についていないか 気泡はないかを必ず確認)

②テスト DNA に Cy3-dCTP を、対照 DNA に Cy5-dCTP を各 3 μ l 加え混合する。

Klenow Fragment(Invitrogen) 1 μ l を加え十分に混合する。

(注 壁についていないか 気泡はないかを必ず確認)

③37°Cで一晩インキュベート

④Stop Buffer(0.5M EDTA)を 5 μ l 加え反応を停止させる。

3) プローブの精製

QIAGEN キットを用いて、添付の手順書通りに処理する。

4) エタ沈・ハイブダイゼーション溶液調整

①各試薬をアシストチューブの中で混合する。

テスト DNA (Cy3) 160 μ l (40 μ l \times 4 本)

対照 DNA (Cy5) 160 μ l (40 μ l \times 4 本)

Solution B (Cot-1 DNA) 100 μ l

3M 酢酸ナトリウム 25 μ l

100% 氷冷エタノール 500 μ l

転倒混和をして遮光箱の中に入れ-20°Cで1時間以上 (Overnight でも可)

②13,000rpm で遠沈 (注 遠心した後紫色のペレットを必ず確認!)

上清を除去。

- ③氷冷した 70%エタノールを 500 μ l 加えチューブを転倒混和する。
- ④13,000rpm で遠沈
- ⑤10 分乾燥する。(注: 必ず遮光)
- ⑥Solution C (master mix) 80 μ l Solution D (yeast tRNA) 8 μ l を加える。
- ⑦37°Cのインキュベーターに 1 時間静置する。(徐々に溶解させる) 注) 遮光
- ⑧タッピングによりペレットを十分混合・溶解させる。
- ⑨70°C15 分間加熱変性させる。
- ⑩37°C恒温槽にて一時間ブリアニリングさせる。

5) プレハイブリダイゼーション

- ①プレハイブリ液を調整

Solution C (Master Mix) 30 μ l

Solution E (Salmon sperm DNA) 10 μ l

- ②70°Cで 10 分間加熱変性
- ③水中で 5 分間冷却
- ④C chip スライドのスポットエリアがわかるようガラスペンでマーク
- ⑤C chip スライド上にプレハイブリ液を 40 μ l アプライし 24×40mm のカバーガラスをかける。
- ⑥湿箱で 30 分間 37°Cのインキュベーターでインキュベート
- ⑦dH₂O のガラスコプリンジャー内でスポットがみえるまで洗浄
- ⑧イソプロパノール処理
- ⑨遠心器にてスライドを乾燥
- ⑩37°Cのホットプレートの上で待機

6) ハイブリダイゼーション

- ①ブリアニリングの終わったプローブを 45 μ l スライドの上にアプライする。
- ②24×50mm の GAP COVER GLASS(松浪)をかける。
(注 スポットにかからないよう。気泡が入らないよう気をつける。)
- ③チャンバーにスライドをセットし 37°Cのインキュベーターに置く。
(注 半日(1 日)に 1 回チャンバーを動かす。水平でないため)
48 時間~78 時間インキュベートする。(中 2 日)

7) アレイの洗浄

試薬の調整 (50ml コプリンジャーの場合)

A.50%ホルムアミド、2×SSC Formamide 20ml 20×SSC 4ml dH₂O 16ml を混合 (pH7.0 に合わせる)

B.2×SSC、0.1%SDS 20×SSC 5ml、dH₂O 45ml、20%SDS 250 μ l 混合
(2×SSC の pH7.0 に合わせた液を 50ml 入れ、20% SDS を 250 μ l 入れる。SDS はよく溶かしてから使用すること。)

C.PN Buffer Sodium Phosphate Buffer 20ml、dH₂O 20ml を混合し pH8.0 に合わせてから NP-40 40 μ l 入れ混合

D.2×SSC 20×SSC 5ml、dH₂O 45ml を混合 pH7.0

- ①A.B.の Wash 液は 45℃の恒温槽に A.の Wash 液は 2 個作っておく。
- ②C.D.の Wash 液は室温
- ③37℃インキュベーターから出しチャンバーを開けたらすぐにスライドを A の 1 つ目の Wash 液に入れる。スライドを前後に揺らしカバーガラスをとる。(45℃)
- ④A の 2 つ目の Wash 液に 15 分間洗浄する。(45℃)
- ⑤B の Wash 液に 30 分間洗浄する。(15 分過ぎたところでスライドをゆらす) (45℃)
- ⑥C の Wash 液に 15 分間洗浄する。(室温)
- ⑦D の Wash 液に 5 分洗浄する。(スポットがみえるまでよく洗浄する) (室温)
- ⑧室温のエタノール (70% 80% 100%) に順番に各 1 分間漬ける。(室温)
- ⑨遠心器にてスライドを乾燥させる。

8) 解析

2-9 遺伝子発現の開始に関する評価技術（東京大学 三宅研）

細胞内において遺伝子の挙動は細胞ごとに異なり、またその発現量も細胞ごとに異なると考えられる。さらに、生細胞観察装置を用いて得られた細胞画像データでは細胞毎にその挙動が著しく異なることがわかった。そのため、このデータを解釈するためには大量のデータを一括に処理し、関連付け、包括的に解釈するシステムが必要となる。本研究では、お互いに挙動の異なる細胞集団の中で遺伝子の発現の開始に関しては、ほぼすべての細胞において細胞周期と非常に強い相関があることを見いだした。

プロジェクト前期では HeLa 細胞に CMV(cyto megaro virus)プロモータに接続された EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein)を導入し、その直後から生細胞観察装置を用いて位相差と蛍光の二種類の画像を撮像し、細胞分裂の様子と EGFP が発現していく様子を 15 分間隔で二日間測定した。また、一細胞毎に、蛍光輝度を測定し、時系列データを取得した。まず、細胞一つ一つに対して得られた時系列データを示す (図 2(9)-1)。これにより、細胞毎の EGFP の時系列はお互いに著しく異なることが分かった。このことは細胞単位では遺伝子の発現が様々であり、時系列データを取得する際、細胞毎の違いを考慮してデータを取得、処理する必要があることを示している。次に、図 2(9)-2 に細胞分裂から遺伝子発現開始までに各細胞が要した時間の頻度分布を示す。その結果、細胞分裂後 100 分前後で遺伝子発現を開始する細胞数がピークとなることが分かった。

プロジェクト後期開発要素としてはその汎用性および遺伝子導入の影響や効率について調べた。具体的には遺伝子導入において、各遺伝子導入方法がどの程度の導入効率を有するのか広く用いられているリポフェクション法をはじめデンドリマーやポリエチレンイミン、リン酸カルシウム法、ウイルスによる導入法、ナノ針を用いた遺伝子導入などの比較検討を行い、次にこの中からリポフェクション法等広く用いられている一般的な遺伝子導入方法において、細胞分裂と遺伝子発現の相関性が確認できることを示した。また、一細胞時系列解析をより正確に行うためには、遺伝子発現が細胞周期に依存して始まるのか、または細胞分裂に伴って発生する核膜消失が原因であるかについてエレクトロポレーションとドキシサイクリンを用いて導入遺伝子を活性化することのできる tet-system を用いて調べた。その結果、遺伝子発現の開始は核膜消失が非常に大きな律速段階であることが示唆された。また、細胞腫を正常細胞に変更しても遺伝子導入ができるよう、遺伝子導入効率の検討を各種遺伝子導入方法（リポフェクション、ウイルスベクタ、その他の遺伝子導入法）を用いて行った。

まず、細胞分裂と遺伝子発現の開始の相関性を調べるために 9 種類の遺伝子導入試薬を用いて相関性を調べ普遍的であることを確認した。更に、細胞種を正常細胞に変えた際にも同様な実験を可能にするために、汎用的に用いられているリポフェクション法、ウイルスベクタによる導入、さらに遺伝子を直接細胞内に送達する方法であるナノ針を用いたインジェクションによる遺伝子導入効率の比較を行った。ここでは正常細胞のケーススタディとしてヒト間葉系幹細胞(以下 hMSC)を用いた。

その後、遺伝子発現の開始に関して、核膜移行依存的であるか、細胞周期依存的であるかについて調べるために、tet-system を用いてトランスフェクション後に遺伝子を活性化させる方法および、エレクトロポレーションを用いて直接核内に遺伝子を送達する方法を用いた。この二方法を用いて、細胞分裂と遺伝子発現の開始時間の相関関係を調べた。また、遺伝子発現と細胞周期依存性について調べるために細胞を細胞周期毎に停止させ、エレクトロポレーションを用いて核内に直接遺伝子を送達することによって発現の有無を調べた。

我々は既に LipofectamineLTX を用いることにより、遺伝子発現の開始と細胞分裂に非常に強い相関があることを報告した。この相関関係が遺伝子導入試薬を変えることによって確認できるか

について調べた。

図 2(9)-3 では 9 つのトランスフェクション試薬を用いて細胞分裂と遺伝子発現開始の相関を調べた。トランスフェクション試薬はその成分に従って主に 5 種に分類され、それぞれカチオン性脂質、カチオン性ポリマー、カチオン性糖、デンドリマー、リン酸カルシウムである。いずれの試薬を用いた時でも、細胞分裂と遺伝子発現との間の平均相関係数は 0.884 ($R^2_{\max}=0.9769$, $R^2_{\min}=0.7458$)であり、非常に高い値を示した。また、それぞれの相関係数に関して検定を行ったところ、すべての相関係数について、統計的に有意であることが示され、今回の相関係数がランダムに得られるものではないことを示すことが出来た。これにより、遺伝子発現と細胞分裂の相関は少なくとも HeLa においては遺伝子導入試薬に非依存的であることが示唆された。

次に細胞を正常細胞に拡大した際に遺伝子導入法による遺伝子導入効率の検討をおこなった。まず、リポフェクション法を用いて遺伝子(pCMV-Venus)を導入し、遺伝子の導入効率を視野内の生細胞数および蛍光を有する生細胞数をカウントし調べたところ Fugene6 を用いた時 31.9% (15 / 47)であり、Lipofectamine LTX+plus 試薬 を用いた時 56.0% (51 / 91)であった。中間評価の報告において、たとえ蛍光を持つ細胞集団であってもその中には自家蛍光あるいは分解されていない蛍光タンパク質をもつ死細胞等を多く含む危険性があることを示唆しており、遺伝子導入効率を正確に評価するためには一細胞毎に評価しそれが蛍光を持ちかつ生細胞であることが重要である。また、たとえ生細胞であっても、遺伝子を導入された細胞には非常に強い蛍光輝度を持つものが観察された。これらの細胞は遺伝子導入によるストレスや培養環境によるストレスにより、遺伝子が正常に働いていない可能性があるため、遺伝子の機能を観察するには注意が必要である。即ち、本来細胞の特性を調べるために遺伝子導入を行うことが多いが、遺伝子を導入したことによって細胞本来の特性が失われる可能性があり、結果として細胞の特性を調べているのか、導入した遺伝子の細胞に対する影響をみているのか判別がつかなくなる恐れがある。そのため遺伝子の発現に対して影響を与える可能性のある培養環境、遺伝子導入試薬、フィブロネクチンやコラーゲン等のコーティング剤に関しては細胞に対する影響を評価する系の開発が必要である。また、これらの実験条件になる場合、細胞に対する影響を評価する方法も考慮することが望まれる。

一方、ウィルスを用いた方法では 37.8% (14 / 37)であり実質的な遺伝子導入効率はリポフェクションと比較して大きく差はみられなかった。ウィルスについては遺伝子がゲノムへ組み込まれる点がりポフェクション法と大きく異なるため目的によって使い分けられることが重要である。

更に遺伝子を物理的に細胞内に送達する方法としてナノ針を用いて評価を行った。ナノ針による方法とは原子間力顕微鏡 (AFM) の探針であるカンチレバーを収束イオンビーム (FIB) によって太さを 400nm、長さ 10 μ m に加工し、ナノ針表面に遺伝子を付着させ、直接細胞の核内に送達する方法である (図 2(9)-4)。この方法により、任意の hMSC に対して、25%の確率で遺伝子を核内に送達することに成功している。

上記実験において、細胞分裂と導入した遺伝子の発現開始時期の相関性の普遍性が高いことを示した。しかしながら、この相関関係は遺伝子発現のメカニズムに対してまだ二つの可能性を明確にしていない。一つは、遺伝子の導入が細胞周期に依存的であるか、二つ目は遺伝子の発現は遺伝子の核膜移行依存的であるかである。前者に関して転写活性は細胞周期の特定の時期にのみにおいて活性が高く、それが今回の実験系で用いた CMV プロモータでは細胞分裂直後である場合が考えられる。転写活性の細胞周期依存性に関しては、カチオン脂質を利用したトランスフェクションには M 期活性が必要であるとの報告がある。後者に関しては核膜が物理的な障壁であり、核の内部では転写活性は細胞周期に非依存的に存在し、遺伝子が核膜移行し核内に入るかどうかは律速である場合である。この二つの問題を解決するためのアプローチを図 2(9)-5 に示す。前者のアプローチに対しては Tet-system を用いて遺伝子発現が細胞周期非依存的であることを明らかにし、後者に関しては Electroporation (Amaxa) を用いて遺伝子発現が核膜移行依存的であることを示した。

Tet-system の実験において、遺伝子を導入後 48 時間培養するため、細胞は少なくとも一回は細胞分裂を起こしていることが期待出来る。そのため、これらの細胞は確率的に細胞質から核内に遺伝子が移行していることが期待出来る。この実験では細胞周期を揃えるような操作をしていないため、ドキシサイクリンを添加し、導入した遺伝子を活性型へ変化させた際、各細胞の細胞周期は細胞毎に異なっている。そのため、遺伝子の転写活性が細胞周期に依存しない場合は、細胞分裂と遺伝子発現の相関が崩れることが期待出来る。一方で、遺伝子の転写活性が細胞周期に依存する場合はいずれの細胞においても、細胞分裂後に遺伝子が発現することが予想されるため細胞分裂と遺伝子発現の相関は崩れないことが期待出来る。図 2(9)-6 に Tet-system を用いた時における細胞分裂と遺伝子発現の相関を示す。この結果、細胞分裂と遺伝子発現の相関係数は $R=-0.01$ であり、Tet-system を用いなかった場合の相関係数よりも大きく低くなり、相関が著しく低くなるのがわかる。これは、細胞内において、転写活性が細胞周期に非依存的である可能性を強く示唆している。

Electroporation を用いた実験において、Electroporation は電気パルスを細胞膜と核膜に与えた際にできる小孔を用いて遺伝子を細胞外から直接核内に送り込むことが出来る。しかしながら、確実に遺伝子を核内に送り込むわけではなく、確率的である。図 2(9)-7 に Electroporation を用いた時の、細胞分裂と遺伝子発現の相関を示す。合計 433 個の細胞に対して遺伝子を導入することが出来、そのうち 75% の 327 個は先に示した結果と同様に細胞分裂と遺伝子発現の強い相関がみられた ($R^2=0.951$)。残りの 25% である 106 個の細胞に関しては細胞分裂と遺伝子発現にほとんど相関が見られなかった ($R^2=0.0007$)。前者の 75% の細胞に関しては電気パルスによって、細胞膜にのみ孔が開けられ、遺伝子は細胞質にしか入らなかったことが考えられる。一方で、25% の細胞に関しては、電気パルスにより、細胞膜だけでなく、核膜まで孔があげられ、遺伝子が核内に直接配送されたと考えられる。また、この 25% の細胞に関してはそのほとんどが、Electroporation による印可から 160 分後に遺伝子が発現しているため、遺伝子が核内に送り込まれてから転写、翻訳され、十分な蛍光を持つまでに少なくとも 160 分程度が必要であることが示唆された。次に、細胞周期を G1 期に停止させて状態で Electroporation によって遺伝子導入をおこなった結果を示す (図 2(9)-8 a)。Mimosine を用いて細胞周期を同調させ、細胞周期をフローサイトメータによって測定した結果を図 2(9)-8 b に示す。Mimosine を添加することによって、G2/M 期の細胞が少なくなり、殆どの細胞が late G1 期に揃っていることがわかる。次に Mimosine を添加し、細胞周期を late G1 期に停止させた状態で Electroporation によって遺伝子導入をした結果を示す (図 2(9)-8 c)。多くの細胞において、Electroporation 後 250 分から 350 分の間に遺伝子を発現していることがわかる。これは、細胞が細胞周期を停止させていても、核内に直接遺伝子を送達することによって送達された遺伝子を転写、翻訳する能力を有していることを示しており、遺伝子の転写には必ずしも細胞周期は必要としないことを強く示唆している。

これらのことより、細胞周期と遺伝子発現の相関性が普遍的であることおよび、遺伝子発現は遺伝子が核膜を通過することが律速となっている可能性が高いことを示した。また、一細胞毎に時系列解析を行うことによって従来のスナップショット解析では得ることのできなかった特徴を得ることができた。この結果は遺伝子発現の開始は細胞周期と密接に関連していることを示唆している。培養中の細胞はその集団の中に様々な細胞周期のものが存在しており、薬剤の刺激に対する反応もまた一様ではない。そのため、細胞毎に刺激に対する応答を正確に捉える事が必要である。本研究では遺伝子発現の開始を捉える事が可能になることから、従来以上に細胞の刺激応答に関して SN 比の高い時系列データの取得が可能になることを示しており、薬剤応答に関するパスウェイ解析に対して強力なツールとなる可能性を示した。

2-10 時系列データ格納用ストレージおよび時系列局所細胞モニタリング装置の開発（東京大学 三宅研）

2-10-1 データ格納ストレージの構築

当該プロジェクトでは時系列撮像に伴い大量のデータが発生する。そのデータの生産量は 10 分間隔で一日 24well のマイクロプレートを 2 色の蛍光および位相差画像を撮像した場合、10368 枚に達しデータ容量としては 28GB 程度となる。当該プロジェクトでは生細胞観察装置をプロジェクト初期において 4 台 (112GB/day)、プロジェクト後半からは 6 台(168GB/day)の生細胞観察装置を用いて実験を行った。そのため、当該プロジェクトのデータを蓄積するためには大型のデータストレージを必要とした。

東京大学（三宅研）では集中件とともに当該プロジェクトを支える大型ストレージの整備および運用を行った。

ストレージの仕様

東京大学に設置したもの	産業技術総合研究所に設置したもの
1) 制御用サーバ <ul style="list-style-type: none"> ・Intel(R) Xeon(R) クロック速度 3.20 EGHz ×1 の CPU を搭載 ・2.0GB RAM の 1 次記憶を搭載 ・250GB (7,200rpm 以上) の 2 次記憶容量 HDD を搭載 ・Gigabit Ethernet インターフェース 2 ポートを搭載 ・オペレーティングシステムとして Solaris 10 が動作可能 ・2Gbit 対応 FC ホストアダプタ×2 を搭載 ・PCI-X[64bit/100MHz・66MHz, Lowprofile]、PCI-X[64bit/66MHz]それぞれ 3 スロットで合計 6 スロット有する ・後述の装置を経由して死活監視可能 	1) 制御用サーバ <ul style="list-style-type: none"> ・UltraSPARC T1 クロック速度 1.0 GHz×1 の CPU を搭載 ・8.0GB RAM 以上の 1 次記憶を搭載 ・73GB (10,000rpm 以上) の 2 次記憶容量 HDD を 2 台搭載 ・Ethernet 10/100/1000BASE-T×4 (RJ45) インターフェースを搭載 ・オペレーティングシステムとして Solaris 10 が動作可能 ・2Gbit 対応 FC ホストアダプタ×2 を搭載 ・PCI-Express [Lowprofile/MD2]が 3 スロット、PCI-X[64bit/133MHz Lowprofile/MD2]が 2 スロットで合計 5 スロット有する ・後述の装置を経由して死活監視可能
2) RAID 装置 10 式 <ul style="list-style-type: none"> ・物理容量 120TB ・RAID レベルは 0/0+1/3/5/6 に対応 ・RAID キャッシュは 512MB 搭載 	2) RAID 装置 7 式 <ul style="list-style-type: none"> ・物理容量 84TB
3) ハードウェアの監視装置	3) ハードウェアの監視装置

ストレージの総容量は 204TB とし、ストレージ内部のデータの移動に関しては光ケーブルを用いることにより、内部のデータ転送が律速段階とならないような仕様にした。また、実際の運用（後述）はネットワークを介した運用も視野に入れるため、データ運用の容易性から東京大学柏キャンパスと産業技術総合研究所・臨海副都心センター内に設置することとした。また、ストレージを分割したもう一つの理由としてデータおよびシステムの冗長性を増すためにストレージを上記二拠点に設置した。東京大学の設置場所については、設置するために配電盤および、ストレ

ージの消費電力を賄うための大型無停電電源（UPS）の整備を行った。

データ格納ストレージの運用

データ格納ストレージの運用としては図 2(10)-1 に示す通り産総研 RICE および東京大学柏キャンパスにデータを蓄積し、各研究拠点からオンラインにてデータの取得を行える体制を整えた。ただし、産総研 RICE についてはセキュリティの問題から産総研外からの接続が認められないため、接続は産総研内部に限られる。しかしながら図 2(10)-2 に記載した通り、産総研 RICE は集中研を内包しており、それ自身でデータの生成および解析が可能である。また、産総研 RICE/集中研は癌研究会および産総研 CBRC とも立地上近接しており、データの蓄積、取得は容易である。また、東京大学本郷キャンパスにて生成したデータについては外部からのアクセスが可能であり、データの授受に問題は発生しない。プロジェクト後期には成果を加速させるために東京大学柏キャンパスに設置したストレージを産総研(RICE)/集中研に移し統合を行った。

図 2(10)-2 により詳細なデータの生成、蓄積および解析の流れを示す。生細胞観察装置により撮像された画像データはデータ取得直後あるいはいったん各ストレージへ蓄積されたのちに必要に応じて各研究機関がダウンロードを行い解析を行う。

このストレージを構築したことによって、生細胞観察装置および時系列局所細胞観察装置により取得されたデータを廃棄することなく蓄積、解析することが可能となった。

2-10-2 時系列局所細胞モニタリング装置の開発

当該プロジェクトにて時系列撮像には生細胞観察装置を用いて来た。しかしながら当該プロジェクトにおいて研究を推進するに当たり、画像解像度の不十分性、時間分解能の限界等が問題として挙げられた。また、生細胞観察装置ではステージ制御のために細いボールねじ構造を採用する必要があるため繰り返し使用することに対して構造強度が不十分であることが判明した。そのため、当該プロジェクトにおいて上記問題点を改善した生細胞局所観察装置の作成を行った。

生細胞観察装置における具体的な問題点としては、1. 画像解像度の不十分性、2. 時間分解能の限界点、3. 装置の頑健性があげられる。

1) 画像解像度の不十分性

プロジェクトにおいて、乳がん関連遺伝子の絞り込みを行い、20 個程度の候補遺伝子を得た。この 20 遺伝子の中にはその発現を時間依存的に変化させ、同時に細胞内の局在性が変化するものも見られた。そのためこれらの遺伝子を評価するためには細胞内において、遺伝子の局在化がどのように時間的に変化しているか等を調べる必要があり、これには生細胞観察装置から得られる情報では不十分である。そのため、共焦点光学装置を有する装置により解析する必要が発生した。

2) 時間分解能の限界点

従来の生細胞観察装置において観測可能な波長は位相差画像、蛍光画像（緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein) 励起波長 488nm, 蛍光波長 508nm、赤色蛍光タンパク質 (Red Fluorescent Protein) 励起波長 588nm, 蛍光波長 618nm）の三種類を観測することが可能である。しかしながら、位相差画像と蛍光画像では異なる対物レンズを用いるため、レンズ交換の時間を要する。また、撮像にあたり、焦点を合わせる時間および、プレートが対象となる位置まで移動する時間が撮像に要する時間となる。生細胞観察装置では 24well のマイクロプレートを用い、3 種の画像を撮像した場合、10 分間隔での撮像が不可能であることから、1 ウェルあたりの撮像時間は 8 秒強と予想される。セルアレイを用いた場合、そのスポット量は最大で 500 スポットであり、すべてを 3 種の画像で撮像した場合撮像に要する時間は 69 分となる。そのため、生細胞観察装置で時系列画像を取得を試みた場合、リアルタイム性を重視すると、その撮像点数は限定される。

そのため、スループットを向上させることは重要である。

3) 装置の頑健性の問題点

生細胞観察装置はその性質上多量の画像を撮像する、そのためには数マイクロから数ミリ単位での微小な移動を繰り返すことになる。具体的に 24 ウェルマイクロプレートを用いた場合、スタートポジションから撮像ポイントまで移動し、ウェル間の移動を繰り返し、ステージの始動と停止の回数は一周期で 25 回、上述のように 3 種の画像の取得を行った場合、24 ウェルの撮像で合計 75 回の始動および停止が必要となる。500 スポットのセルアレイの場合は約 1500 回の始動および停止が必要となる。そのため、ステージの移動を制御するボールねじには非常に大きな負荷がかかる。また、画像解像度の不十分性で述べたような遺伝子の時間変化をより精密に追跡した場合、現状よりもより多量の撮像を必要とすることが考えられる。現行の生細胞観察装置ではこのボールねじの摩耗が装置の耐久性を決定している大きな要因であり、また該当部分の故障により非常に大きな修理費を必要とする。そのため、繰り返し撮像を行うためには装置の頑健性の改良が必要となる。

上記問題を踏まえて、共焦点光学装置を備えたうえで時間分解能の向上と装置の頑健性を備えた装置を作成した。その仕様は次の通りである。

仕様

本装置は長時間の生細胞の変化を経時的に観察する装置であり、細胞を培養しながら経時的に蛍光画像および位相差画像を自動取得することにより、リアルタイムに近い時間分解能で細胞の形態や蛍光強度を測定することを目的とする。更に共焦点機能により高い SN 比および細胞内局在を認識しながらの測定を目的とする。以下仕様に関して、装置部分、一般仕様部分、画像解析部分の 3 部分に分けて記載する。

1. 装置部分

1. 1 測定対象

- ・ハイスループット解析をするためにマイクロプレート (6wells ~ 96wells) の測定が可能であること。
- ・通常のスライドガラスをもとにしたセルアレイ(例えば 15 x 37 = 570 spots のセルアレイ等)の解析も可能なこと。但し、セルアレイを使用の際には大きさを調節するためのアジャスタを用いてもかまわない。セルアレイを入れるためのアジャスタは滅菌可能であること。

1. 2 測定培養条件

- ・全てのマイクロプレートおよびセルアレイを用いたとき、その試料の環境が 37°C、5% CO₂、加湿機能を有すること。加温実験に際しては試料温度を 45°C に保つことが出来ること。
- ・セルアレイを用いたときの長期培養を可能にするため灌流装置を有すること。

1. 3 測定ステージ性能

- ・マイクロプレートを測定するために可動 XY ステージを有すること。
- ・上記ステージの可動範囲は 80mm x 120mm 以上であること。
- ・「1. 1 測定対象」において記述した全てのマイクロプレートおよびセルアレイの全てのウェル (セルアレイではスポット) に対して 3 種の画像の撮像を 10 分間隔で数

日間行った際ステージ駆動部に機械的な支障を来たさない頑健性を有すること。

1. 4 測定機能

- ・1000 x 1000 画素以上の EMCCD カメラを少なくとも 2 台有し、多色同時撮像が可能であること。同時励起のために 2 色の励起光の同時出力が可能であること。
- ・タイムラプス測定が可能であること。スナップショット撮像が可能なこと。
- ・レーザー共焦点機能を有すること。生細胞に対する光毒性および蛍光の退色の観点からマイクロレンズ付ニポウディスクを用いることが望まれる。
- ・2 色の分光ユニットを有し、GFP (488nm) および HcRed(588nm)等に対応可能なこと
- ・位相差画像および 2 色以上の蛍光画像の測定が可能であること。
- ・撮像に関してオートフォーカス機能を有すること。
- ・「1. 1 測定対象」にて記述したいずれのマイクロプレートを用いて全てのウェルに対して位相差画像および二色の蛍光画像を撮像する条件において、要する撮像開始から終了までの時間が 10 分以下であること。

具体的に 96 wells のマイクロプレートを用いた場合、露出時間を 300msec と想定したとき、位相差 96 枚、蛍光画像 192 枚、計 288 枚の画像を取得する際ステージ移動、レンズ交換の全ての時間を含めて 10 分以下で撮像が可能なこと

- ・ステージの繰り返し移動に伴う測定対象物の座標誤差が数 μm 程度であること。但し、後述するソフトウェアによって高精度に補正できるのであればこの限りではない。
- ・対物レンズとして位相差画像および蛍光画像のそれぞれについて倍率 200 倍と 400 倍の画像の表示が可能なこと。またそれに適合するレンズを具備すること。セルアレイの測定に関して長作動 40 倍レンズを有すること。対物レンズは設計により、2~4 本になるが、但しこれらのレンズを全て同時に搭載する必要は必ずしもなく、必要に応じて簡便に交換が出来ればよい。レンズ、光学素子は上記測定において十分に明るい画像が得られる装置を有すること。位相差用対物レンズについては以下の性能のレンズを用いることが望まれる (20 倍 NA 0.4 以上、40 倍 NA 0.6 以上)。また、蛍光用対物レンズでは以下の性能を持つレンズを用いることが望まれる (20 倍 NA 0.75 以上、40 倍 NA 0.9 以上)。

2. 一般仕様部分

- ・測定試料に対して遮光性を有すること。
- ・消費電力として通常の電力 (100VAC, 20A) が 1 あるいは 2 系統程度以下であること。但しオペレーションを行うワークステーションはこれに含まない。
- ・周囲動作環境が 15~35°C, 湿度 10%~80% で正常に稼動すること。
- ・外寸が 1300W x 1300W x 1500H (mm) 以下であること (オペレーション用のワークステーションはこれに含めない)。重量が 500kg 程度であること。
- ・使用者に対して機械系、電気系、光学系に対して安全性の配慮がなされていること。

3. 画像取得部分

3. 1 蛍光画像撮像

- ・蛍光測定を可能にするため、GFP および HcRed を励起できること。
- ・上記蛍光を励起するための光源を有すること。発熱量、電源容量およびランニングコストの観点から固体レーザーを用いることが望ましい。
- ・レーザーの出力調整機能を有すること。
- ・レーザーに関してシャッター機能を有すること。

4. 画像解析部分

4. 1 基本情報の付加

- 6wells, 24wells, 96wells およびセルアレイを装置に対して設置した際それらの実験情報等基本情報を円滑に格納し操作できるようなソフトウェアを有すること。ここで基本情報とは、アッセイ名、細胞種、プレート種、測定ターゲット、蛍光試薬、添加試薬濃度等を示す。また基本情報に関するコメント機能を付加できること。
- 観察条件として、位相差および蛍光画像のレンズ倍率、露光時間、撮像間隔、総撮像回数、1well 内における撮像枚数、測定位置、共焦点機能の使用の有無について選択が可能であること。

4. 2 数値化情報の付加および画像の判定

- 上記装置から取得された画像および付加した基本情報を用いて画像処理を行う機能を有すること。処理対象の殆どは生細胞であるが、必ずしも生きた細胞であるとは限らない。特に蛍光画像における画像処理は細胞に限らず蛍光の有無が重要となるため以下画像内において処理する対象を対象物と記述する。
- 対象物ラベリング機能：画像内における全ての対象物あるいは蛍光が観察された対象物に対して個別に認識しナンバリングすることによりお互いに区別する機能を有すること。
- 数値化機能：上記対象物ラベリング機能において認識した全ての対象物に対して、その総蛍光強度、面積、単位面積当たりの蛍光強度、真円度、位置座標、周長などの統計量を数値化できること。
- 対象物追跡機能：タイムラプス測定において大量に連続撮像された各画像に対して上記対象物ラベリング機能により数字を付加し経時的に対象物を区別した画像群に対して、各対象物の位置座標を取得し近傍であるものに対して同一の対象物であることを判定できる機能を有すること。また画像中の全ての対象物に対して上記情報を取得できる機能を有すること。
- 細胞死判定機能：上記対象物ラベリング機能において取得された画像に対して、特に対象物が細胞であった場合、その生死を何らかの手法を持って検出できる機能を有すること。具体的には小核試験などを利用し、その大きさを区別する機能を有すること。但し、細胞死判定に関してはその判定精度が十分とみなすことが出来れば小核試験に限定しない。
- 画像と数値情報のリンク機能：上記数値化した情報（トレンド情報）に対して位相差画像、蛍光画像とのリンクが付加されており、任意のトレンド部分の画像を **Graphical User Interface (GUI)** を用いて容易に取得できること。具体的にはトレンドグラフの任意の特徴を持つ点に対してマウスポインタをクリックすることによりその数値に対する位相差画像および蛍光画像が表示される機能を有すること。またそれらを複数点選択して容易に保存できること。撮像画像に関して各波長の画像同士あるいは蛍光画像と位相差画像のマージが容易に出来ること。

上記仕様により作成された時系列局所細胞モニタリング装置では 96 ウェルプレートを用い 2 色の蛍光画像および位相差画像の 3 種の画像を取得した場合においても 10 分以内にすべての画像を撮像することが可能となり、生細胞観察装置に比べて撮像速度を速くすることができた。また、新たに 40 倍の対物レンズを搭載したことにより、画像解像度の向上およびボールねじについても通常の市販品の 2 倍以上のサイズのものを用いることにより耐久性を向上させることができた。

2-11 補遺（精密解析が必要な理由）

HTSで大規模に遺伝子絞り込みを行ってもヒットが得にくい理由には幾つかの要素が考えられるが、まず、外部からの刺激に対して細胞が示すこととの関係が明瞭ではないことを考えてみる必要がある。前述のように、細胞内の遺伝子や他の分子の機能は複雑に関係し単純でない形で分岐するのみならず時間的にも変化する。遺伝子を論理的なノードとして単純な役割を想定して解析してみても、現実の細胞内反応と対応していない可能性が大きい。特にsiRNA等による遺伝子に対する干渉実験によってその遺伝子の特性を十分記述できるかどうか不明なところが多い。遺伝子干渉の実験は、平面的な（2次元）論理構造を想定するケースが多いが、細胞内の論理構造は少なくとも4次以上の高次構造であって、一般的には解析できない対象が多いものと考えられる。希に簡単な構造を有する遺伝子群の機能を対象としたときに、簡単な前提で重要な遺伝子を見いだすことが可能な場合がありうる。しかし、この種の経験は帰納的にHTS・解析手法の有効性を証明するものではない。ゲノム新薬の数の少なさは、解析の困難さを現に示していると言えよう。

また、実験とそれをベースとした論理的に求めうる構造と、創薬に要求される知識の間に大きなギャップがあることも重大な問題である。科学の実験では、実験の論理に即したリファレンスが必要となる。この関係を適宜曖昧にして、操作上の利便性が問題解決に係わるような定式を与えることは科学的であるかどうか、深く考える必要がある。遺伝子スクリーニングの効率化は、遺伝子の相互関係の解明と係わらないし、まして互いにリファレンスになり得ない。遺伝子の相互関連構造を解明することに直接関係していない以上、スクリーニングの効率化をもって主要なソリューション技術とすることは、長期的には無理があると言わざるを得ない。

第3章 デバイス関連技術開発

3-1 デバイス開発の必要性（がん浸潤転移を例として）

現在、全世界で740万人ががんで亡くなっており（2004年現在）、WHOの試算によると2030年にはその数が1200万人に達すると言われている⁽¹⁾。日本においても1983年を境に男女ともに主要死因の1位が「脳血管疾患」から「がん」へと取って代わり、今日では年間約33万人、すなわち日本人の3人に1人ががんで亡くなっている^{(2),(3)}。このがんにおける死因の9割が転移によるものとされる。全国がん（成人病）センター協議会加盟施設での1998年から2001年の診断例を用いた統計によると、全がんにおける臨床病期がステージIの場合の5年相対生存率が92%、ステージIIでは80.8%、ステージIIIでは47.6%である。その一方で、UICC TNM分類では多くのがん種で遠隔転移がその分類条件になっているステージIVにおいては、驚くべきことに16.9%にまで急激にその値が落ち込んでいる⁽⁴⁾（図3(1)-1）。診断確定時に検出限界以下の転移開始状態である可能性が各ステージの生存率低下の一因と思われるが上記統計結果より、多くのがん種において限局されたがんのコントロールは可能であるものの、遠隔転移を起こした症例では治療効果が非常に低い現状が窺える。

一般的に転移は大きく4つのプロセスに分けられると考えられている⁽⁵⁾（図3(1)-2）。まず初めに、①原発巣で血管新生を起こすなどして増殖した腫瘍塊より転移性細胞の離脱がおこる。固形がんの80%以上は上皮系細胞由来である。その場合、離脱に際して周囲の細胞との強固な細胞間接着を喪失し、ある程度自由に運動できるようになること、さらに基底膜の破壊が必須となる。基底膜はIV型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンから構成され、通常は高分子タンパク質も容易に通過できない、密で強固なシート状の細胞外マトリックスである。転移性細胞はプロテアーゼを分泌し基底膜を破壊することで通過し、さらに行く手を阻む間質細胞外マトリックスを分解しつつ、かつ細胞外マトリックスファイバーを足場にしながら進んでいく。次に②がん細胞は血流もしくはリンパ系に進入する。この際に血管壁を通過する必要があるが、新生されたばかりの幼若血管以外の血管では基底膜が存在し、ここでも基底膜破壊が必要になる。さらに③血管内皮細胞へ接着し基底膜を破壊することで血流から脱出する。そして最後に④血流から離脱したがん細胞は、再び間質細胞外マトリックスを分解し、到達部位で再増殖を始め遠隔転移が成立するのである。がんの5年相対生存率を上昇させるためには、原発巣で再生する能力を持つすべての腫瘍細胞を根絶し、上述のメカニズムで成立する転移をいかに抑制するかが重要となる。

実際の治療現場では、外科手術や放射線や重粒子・陽子線療法、また化学療法によって悪性細胞の数が検出限界以下に減少すると、患者は臨床的に完全寛解しているとされる。この検出限界とは、臨床的診断あるいは放射線診断による大部分の固形腫瘍において約1g（ 10^9 細胞におよそ相当する）の組織量とされている。また抗がん剤開発の臨床試験最終段階においても腫瘍の縮小が臨床試験の主な評価項目や目標となっている。つまり、局所療法後に臨床的な完全寛解や生検で組織学的に確認される完全寛解の場合でも約1g以下の組織が残存している可能性は否定できない。さらに治療前に腫瘍が存在した部位を外科的に生検することで検出の限界を下げるのが可能ではあるが、1000個の正常細胞の中に1個以下の割合で存在する腫瘍細胞を検出するのは難しい。そのため生検組織で完全寛解を確認できる場合でも同様に、多数の腫瘍細胞が残っている可能性が常に付きまとうのである。そしてこの根絶できなかった腫瘍細胞をもとに再発や転移が起こることは想像に難くない。この問題に対して近年、手術や放射線による局所治療後に、補助化学療法（アジュバンド化学療法）が行われ、乳がんや大腸がんのような一部の悪性腫瘍の治癒率の向上には効果を示している。だが結局化学療法剤の開発自体も臨床現場と同様の指標を元にその薬効が評価されているという経緯から、がん細胞をすべて根絶することは困難である可能性が高く、結局新規の高活性な化学療法剤の探索が続いていくのである。また、手術や放射線で原発腫瘍を治療する前にネオアジュバンド化学療法と呼ばれる補助化学療法が行われることが

ある。この方法は原発腫瘍の薬物への反応性が分かることや、手術中ががん細胞が血流中に散布され広がるのを防げる可能性もあるという利点があり、HER2 陽性の乳がんに対する臨床試験では、高い病理学的奏効を得られている。一方で、頭頸部がんなどにおける放射線治療との組み合わせの場合と単独を比較してもその生存率は認められなかったことなどからまだすべてのがん種に対して有効とされていない。このように、現在の医療現場において、「再生する能力を持つすべての腫瘍細胞を根絶し、上述のメカニズムで成立する転移をいかに抑制するか」という命題に対して答えきれない状況があると言える。

一方医薬品開発に目を向けると、平成 21 年 9 月現在で製薬協に公表されている各フェーズにおいて開発中の 100 近くの抗がん剤のうち、7 割以上が腫瘍増殖の阻害作用を持つものである⁽⁶⁾。これらの中でも副作用が激しいとされる化学療法剤は、がん細胞と正常細胞を区別せず分裂中(増殖中)の細胞を標的とする。一部のがん種を除きがん細胞よりも早く増殖する正常細胞が存在するが、それに影響をきたすことから問題である。また、通常、がん細胞は全滅する前に薬剤耐性を獲得すること、がん細胞の「親玉」であり、再発や転移の核となる「がん幹細胞」は化学療法(及び放射線療法)では容易に死なないと言われており、やはり腫瘍細胞の根絶は難しいと思われる。次いで約 2 割を占めるのが血管新生阻害薬である。血管新生を阻害することは、原発巣での腫瘍の増大を抑えられるほかに転移を抑制することも期待でき、VEGFR に対する抗体薬であるアバスタチン(一般名ベバシズマブ)などは既に上市されている。しかし最近実験動物レベルの結果であるものの、この VEGFR2 に対する抗体(DC101)や多標的受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブを投与すると腫瘍が縮小するが、腫瘍辺縁で浸潤が認められるとの報告がある⁽⁷⁾。また、現在治験中であるインテグリンに対する阻害薬は低濃度ではかえって血管新生を亢進させてしまうとの報告⁽⁸⁾や、この阻害薬により EGFR を介した細胞運動能の増強が起きるとの報告⁽⁹⁾もあるため、併用でその欠点を補うことが重要であると考えられる。このほかには免疫賦活を目的とした薬剤なども開発中である。

しかしながら、最も重要である転移阻害をキーワードとした薬剤開発はほとんど行われていないのが現状である。RANKL 標的モノクローナル抗体であるデノスマブは中でも骨転移を阻害する薬剤として現在 Phase III で治験中である。骨転移は骨組織を破壊するためがん細胞が正常骨に存在する破骨細胞の力を借りることで起こる。すなわち、転移したがん細胞はパラサイロイドホルモン関連タンパク PTHrP を分泌し、これに刺激された骨芽細胞が RANKL を発現する。次に前破骨細胞に RANKL へ結合する RANK が発現され、前破骨細胞が破骨細胞に分化し、その数が増大する。そして増大した破骨細胞が骨を溶かす過程で TGF- β や IGF などが骨から溶け出し、がん細胞の増殖などを刺激するという悪性のサイクルが骨転移巣で生じている。デノスマブはこの破骨細胞分化を抑制するものであるため、他の臓器を遠隔転移先とする場合の抑制には用いることができない。また、細胞増殖に係わるシグナル伝達で重要な役割を担う、世界最初のがん遺伝子である Src を標的としたダサチニブ、ボスチニブ、サラカチニブなどが開発されている。特にサラカチニブの固形がんに対する第 1 相試験では、細胞運動に関する遺伝子である、focal adhesion kinase (FAK) と Paxillin をバイオマーカーとして用いており、50mg/日、125mg/日、175mg/日投与したところ、免疫組織学的手法により、175mg/日群でリン酸化 FAK およびリン酸化パキシリンの減少が見られ、最大耐用量(MTD)は 175mg/日と決定されたという経緯もある⁽¹⁰⁾。さらに培養細胞レベルではがん細胞の浸潤能が低下していることが確認されている⁽¹¹⁾ことから、転移抑制としての効果が期待されている。

既にいくつか列挙したが、近年がん分子標的薬の開発が盛んになり一部で臨床使用が可能となっている。がん分子標的薬は、がんの生物学的特性を背景に同定された標的分子に対して特異的に作用するようにデザインされたにも関わらず、トラスツズマブ(ハーセプチン®)は HER2 陽性例中、単剤での有効性は 20%程度である。また、ゲフィチニブ(イレッサ®)の感受性因子である EGFR 変異については開発の段階ではなく臨床使用後に発見された知見であることなどから

も、未だその研究開発手法は発達段階と言わざるを得ない。またトラスツマブの心障害やゲフィチニブの間質性肺炎の発症など、重篤な副作用が発現することも知られている。このように分子標的薬の場合でもその効果・安全性の予測は十分とはいえず、分子生物学的、遺伝子工学的手法の進歩により検出手段が飛躍的に向上したバイオマーカーを用いて、抗がん剤の薬効や副作用を予測する試みが近年多く行われている。この流れは分子標的薬開発のみにとどまっていない。製薬協のデータブックにおける開発段階別化合物数と承認取得数をみると、2003年から2007年の5カ年の累計において、合成（抽出）化合物数は563,589個を数えるのに対し、自社で承認を取得したものは26個に過ぎず、累計成功率は21,677分の1である⁽¹²⁾。さらに抗がん剤に限定した場合はより低くなると思われるが、この開発段階の効率向上が主眼に置かれつつある。実際、FDAは2006年3月に新薬開発過程における、有効性・安全性・予測性・生産性を向上させるために6つの重点研究テーマを指定し、創薬開発システムの改革を促している(Critical Path Opportunities Report/List)。この6つの重点テーマの中に「新規バイオマーカーと疾患モデルの開発」が含まれている。厳密には、創薬プロセスに関わるバイオマーカーのうち、創薬・治療ターゲットによる候補薬剤のスクリーニングと疾患の診断を目的として、診断マーカー・疾患マーカーが利用される。前臨床試験から臨床試験までの治療効果判定と疾患の臨床モニターを期待して利用されるのが代理マーカーであり、このマーカーは、短期間の観察期間で真の有効性評価を代替できるバイオマーカーであるといえる。これに対して、長期間での再発・転移・生存などの評価を目的として利用されるのが予後マーカーとされているが、実際には機能と使用時期は相互に重複している。これら4種のマーカーのがんに限定しない特許の日米欧の比較をすると、診断マーカー・疾患マーカーの特許出願件数は欧米を上回っているが、新薬開發生産性向上につながる物として大きく期待できる、代理マーカー・予後マーカーの出願特許件数では欧米にはるかに及んでいない⁽¹³⁾。さらに、実際のがん臨床において使用されているバイオマーカーは乳がんのトラスツマブ投与におけるHER2の発現状態などわずかであり、多くのものは研究の域を脱していない。このことからバイオマーカーの有効な同定手法の開発も重要であると思われる。以上のことから医薬品開発の現場においても医療現場と同様にまだ命題に答えきれていないのである。

以上のことから転移の本質を理解し、創薬ターゲットやバイオマーカーを同定することは最重要課題である。1972年以降NCIの助成金で転移に焦点を当てた研究提案は全体の0.5%以下であった。また、2008年度のNCIの研究助成金128億ドルのうちの2.9%が転移をキーワードとしたものであり、前年の2.7%からほとんど変化していない⁽¹⁴⁾。がん全体の研究規模に比して転移研究が占める割合があまりにも少ない背景に、転移という現象が前述のように非常に複雑で実験的に再現解析することが難しいことが挙げられる。

今日、培養細胞レベルで浸潤する際の細胞運動を再現した解析手法として損傷治療法やボイデンチャンバー法が汎用されている^{(15) (16)}。損傷治療法はコンプレントになっている細胞を部分的にチップやスクレーパーなどで物理的にはがし、その後できた空間を近接した細胞が移動することで埋めていく反応を観察する手法である。しかしながら、この手法により相反する結果が報告されることがままあるのが現状である。このような結果が得られる原因のひとつとして、運動しているのは先頭の細胞のみで、先頭の細胞と接着している残りの細胞はただ引きずられているにもかかわらず、この性質が異なる細胞を混合した状態で評価しているために起きると考えられている。さらに細胞をはがす際に起きる物理的衝撃で細胞の内容物が培養液中に流出するなど、別の要因に応答する因子が偽陽性として単離されることが無視できないといった問題もある。一方、Boyden chamber法ではフィルターで仕切られた二層のチャンバーの下部に誘引物質、上部に細胞を添加し、誘引物質を感知してフィルターを通り抜けて下層のチャンバーに移動した細胞数で運動性を判断する手法である。また上部にコラーゲンゲルを重層することでより間質を浸潤していく際の状態を再現したinvasion assayなども汎用されている。しかし、このBoyden chamber法も運動に依存せず下層に沈んでしまった細胞のコンタミネーションなどによって再現性を取るこ

とが難しく、偽陽性が混入しやすい。以上の問題点から、上述手法を個々の遺伝子解析から各種ライブラリーを用いた大規模スクリーニングへとスケールアップを行った場合、どうしても細胞運動以外の機能を持つ擬陽性のコンタミネーションが多くなるのが容易に予想できる。確かに上述の手法を用いてスクリーニングを行ったという報告は数報ある^{(17), (18)}。これらの研究を通してスクリーニングされた遺伝子のデータが積み重なることで、研究者は価値あることとの錯覚へ陥ってしまいがちである。しかしながら上述のような問題を内包しているためにその後の機能解析において不利になってくることは否めず、未だ包括的な理解に至ることができないものと思われる。そこでこれらの欠点を踏まえ、より生体内での状況を反映した、新たな切り口のがん浸潤・転移能ハイスループット検出デバイスを構築するべく研究を展開した。

次に、がんゲノム創薬のみならずゲノム創薬には遺伝子や対象となるようなタンパク質等を対象細胞に導入することは非常に重要である。また、導入した遺伝子等に対して、これらを適切な時間に発現するよう制御することが重要である。しかしながら、現在主流となっているリポフェクションでは細胞種によって導入効率が著しく変わり、遺伝子の発現も細胞分裂を起点にランダムに発現する。東京大学・鷺津研はこの遺伝子導入の問題に対し、電解集中型エレクトロポレーション法の開発を通して細胞に非常に低侵襲な条件で遺伝子およびタンパク質等を導入することを可能とした。細胞に対して物理的に遺伝子等を導入する手法は細胞種の性質に依存せず、遺伝子等を導入することが可能であり、非常に高い価値を持つと考えられる。また、該当技術はその簡易な構造により、デバイス化が容易であり、また技術的にも簡便であることから新たな低侵襲遺伝子導入法として非常に高い汎用性を持つと考えられる。導入した遺伝子の時間的制御については東京大学・長棟研によって技術要素が開発された。具体的にはプラスミドにケージド化合物を結合させることによって転写翻訳を光照射のタイミングで発現させる技術である。これにより、従来法よりも弱い光毒性で遺伝子発現誘導が可能となると共に、遺伝子のみならず、shRNA や RNA アプタマーへの転写も同様に光制御できる技術であるので、目的遺伝子のノックダウンや目的タンパク質の活性阻害についても時間的制御が可能と考えられる。

- (1) WHO HP より (<http://www.who.int/cancer/en/>)
- (2) 厚生労働省 HP より ; 「死因年次推移分類別にみた性別年齢調整死亡率 (人口 10 万対)」 (http://www1.mhlw.go.jp/toukei/toukeihp/11nenpo_8/deth13.html)
- (3) 財団法人がん研究振興財団 HP より ; 「主要死因別年齢調整死亡率年次推移 (1947 年~2007 年)」 (<http://www.fpcr.or.jp/publication/pdf/statistics2009/date09.pdf>)
- (4) 財団法人がん研究振興財団 HP より ; 全国がん (成人病) センター協議会加盟施設における 5 年生存率 (1998~2001 年診断例) (<http://www.fpcr.or.jp/publication/pdf/statistics2009/date07.pdf>)
- (5) Joyce JA and Pollard JW: “Microenvironmental regulation of metastasis.”, *Nature Reviews Cancer*. 2009 Apr;9(4):239-52.
- (6) 製薬協 HP より (<http://www.jpma.or.jp/medicine/shinyaku/development/index.html>)
- (7) Páez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D and Casanovas O: “Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.”, *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):220-31.
- (8) Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC and Hodivala-Dilke KM: “Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors.”, *Nature Medicine*. 2009 Apr;15(4):392-400.
- (9) Caswell PT, Chan M, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Boettiger D and Norman JC: “Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments.”, *Journal of Cell Biology*. 2008 Oct 6;183(1):143-55.

- (10) Tabernero J, Cervantes A, Hoekman K, Hurwitz HI, Jodrell DI, Hamberg P, Stuart M, Green TP, Iacona RB and Baselga J: “Phase I study of AZD0530, an oral potent inhibitor of Src kinase: First demonstration of inhibition of Src activity in human cancers.”, *Journal of Clinical Oncology*. 2007 June 20; 25(18S): 3520 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).
- (11) Ngo HT, Azab AK, Farag M, Jia X, Melhem MM, Runnels J, Roccaro AM, Azab F, Sacco A, Leleu X, Anderson KC and Ghobrial IM: “Src Tyrosine Kinase Regulates Adhesion and Chemotaxis in Waldenstrom Macroglobulinemia.”, *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 1;15(19):6035-41.
- (12) 日本製薬工業協会 DATA BOOK 2009: 49. 「開発段階別化合物数と承認取得数」
- (13) 畠山裕司 「バイオマーカー関連研究分野の特許出願動向からみた創薬プロセスの効率化に向けた日本の課題」 医薬産業政策研究所リサーチペーパーシリーズ 2009 Oct; 46
- (14) NCI HP より (<http://fundedresearch.cancer.gov/search/funded?action=full&fy=PUB2008&type=sic>), (<http://fundedresearch.cancer.gov/search/funded?action=full&fy=PUB2007&type=sic>)
- (15) Nobes CD and Hall A: “Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.”, *The Journal of Cell Biology*. 1999 Mar 22;144(6):1235-44.
- (16) Boyden S: “The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.”, *The Journal of Experimental Medicine*. 1962 Mar 1;115:453-66.
- (17) Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, Khvorova A and Brugge JS: “Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach.”, *Nature Cell Biology*. 2008 Sep;10(9):1027-38.
- (18) Gunawardane RN, Sgroi DC, Wrobel CN, Koh E, Daley GQ and Brugge JS: “Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion.”, *Cancer Research*. 2005 Dec 15;65(24):11572-80.

3-2 がん浸潤・転移能検出デバイスの開発（東京大学 長棟研、産総研 RICE（臨海））

がんの浸潤・転移機構の解明は、がん治療や創薬における最重要課題である。産総研 RICE（臨海）では、細胞の運動性を指標として浸潤転移マーカー探索を行う細胞運動性評価チップの開発を行い、東京大学（長棟研、鷺津研）では、擬似組織モデルへのがん細胞の浸潤を指標とした評価チップの開発を行った（図 3(2)-1）。

3-2-1 がん浸潤能検出デバイス（東京大学 長棟研）

中間評価までに、細胞膜修飾剤（**Biocompatible anchor for membrane: BAM**）でコートしたガラス基板上に細胞を高密度に固定化し、それを望みの表面に押し付けることによって細胞層を転写する技術を確認した。この細胞転写技術を用いて、細胞外マトリックス（**Extra cellular matrix: ECM**）の主成分であるコラーゲングルや、マウス肉腫由来の基底膜であるマトリゲル上に、平滑筋細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞を重層した組織モデルの構築に成功した。

中間評価以降は、細胞転写技術を用いて血管内皮モデル中にがん細胞マイクロアレイを構築し、血管内皮モデル内で浸潤を網羅的に評価する技術の開発を行った。がん浸潤のメカニズムの理解は創薬にとって重要であり、網羅的な遺伝子ネットワーク解析が有効な手段である。また、がんの浸潤はがん細胞の周辺環境に大きく依存することから、各遺伝子の浸潤への影響を正確に解析するには生体内環境下での実験が不可欠である。従来のハイスループット手法のように単純な集積化では生体内の環境と著しくかけ離れてしまい、細胞の特性が維持できない可能性があるため、有効な解析が行われていないという問題がある。従って、生体内に近い環境下で網羅的な遺伝子ネットワーク解析を実施する手法の確立が必要である。本研究の浸潤評価システムでは、生体内に近い血管内皮モデル内での浸潤現象を指標に、ハイスループットな遺伝子ネットワーク解析が実施できる点に大きな価値があると考えられる。

まず、BAM コート基板に固定化したがん細胞アレイに対して cDNA プラスミドや siRNA を導入後、それらをコラーゲングル上に転写することによって、特定遺伝子の発現を制御した細胞マイクロアレイをモデルマトリックス上に構築することに成功した。次に、コラーゲングルの上に siRNA を導入したがん細胞のスポットを転写し、さらにコラーゲングルを上にも重層することによって、がん細胞アレイをコラーゲングル中に包埋した。1~3 日間培養後にコラーゲングル中でのがん細胞の浸潤を蛍光イメージャーで観察したところ、がんの浸潤性に依存するスポットの拡がり確認され、スポットの直径を指標に浸潤性を評価できることを見出した。このがん細胞スポットの直径を指標にした評価法は、特定遺伝子の発現を増減させた細胞の浸潤性をハイスループットに評価できる技術につながると期待される。

浸潤評価システムの構築のために開発した核酸導入細胞マイクロアレイ転写技術は、がん細胞アレイの血管内皮モデル上への転写に限らず、様々な細胞アレイを研究対象に応じた表面上に転写するのに応用可能である。本技術は実用化できるほど成熟しており、提携企業が見つかり次第、実用化を進められる。

【研究の位置づけ】

siRNA などの核酸を導入したがん細胞のマイクロアレイを血管内皮モデル中に作製し、生体内に近い環境下で浸潤を網羅的に評価する世界初の技術と位置づけられる。

【科学的視点】

がん細胞の浸潤は、細胞の上皮間葉変換、細胞外マトリックスの分解、細胞遊走といった複数のプロセスから成る。従って、浸潤に関わる遺伝子数は多く、それらが複雑に相互作用しているため、浸潤のメカニズムを解明するためには網羅的な遺伝子解析が有効な手段である[1]。一方、

がん細胞の浸潤は、周囲の細胞外マトリックスや細胞層、それらから放出される誘引物質などの細胞外環境に大きく依存する。そのため、各遺伝子の浸潤に対する影響を詳細かつ正確に比較・解析するには生体内環境下での実験が必要であり、ハイスループットな解析システムを構築するのが困難であった。今回研究したがん細胞浸潤評価システムでは、網羅的な遺伝子ネットワーク解析を、生体内環境に近い血管内皮モデルへの浸潤現象を指標に実施できる点に大きな価値があり、浸潤のメカニズム解明を大きく進展させる手法であると期待できる。

【技術的視点】

がんの浸潤性に関与する因子を評価する技術としては、**Boyden chamber** を用いてマトリゲルを浸潤したがん細胞数を評価する方法が最も一般的である[2, 3]。この従来法は、ウェルフォーマットの実験系であるため、マイクロアレイ系に比べて一度に処理できる検体数が少なく、また、細胞数計測による評価であるために解析が煩雑で時間を要する。さらに、多数検体を解析するには、高価なマトリゲルの使用量も問題となり、マトリゲルは生体内の細胞層を含む環境とは大きく異なるという問題点もある。一方、今回開発研究を実施した浸潤性評価セルアレイ技術では、検体の高集積化と蛍光イメージングによる迅速評価によってハイスループットで低コストな解析が実現できる。さらに、血管内皮細胞層を含む血管内皮モデルへの浸潤を指標にした評価ができるため、*in vivo* 実験と近い結果が得られると考えられる。また、**RICE** 臨海で開発した運動性評価セルチップと同じフォーマットで浸潤性を評価可能であるため、分析結果の相互比較によってスクリーニング精度が向上することも期待できる。

従来の細胞マイクロアレイ技術は、ハイスループット性は高いものの、試料を網羅的に細胞に取り込ませるための極めて人工的なデバイス環境上で、細胞の表現型を評価せざるを得ない。接着性の細胞では、接着状態の違いが細胞の生死や分化に大きく影響することが報告されている。従って、従来の細胞マイクロアレイ技術においては、人工的な表面との接着によって誘発される擬陽性や擬陰性の存在が考えられる場合もある。本研究で開発した細胞アレイ転写技術は、細胞が接着し得る任意の表面上に、細胞アレイを転写できることから、生体内に近い表面上での表現型が評価可能となる。本研究では、血管内皮モデル上での浸潤評価に細胞アレイ転写技術を用いたが、今後様々な応用研究が考えられ、非常に価値の高い技術である。

本核酸導入細胞マイクロアレイ技術は、十分に実用化できるほど成熟しており、提携企業を探している段階である。

【研究成果】

がんの浸潤・転移の関連遺伝子の探索と評価は、新たな創薬ターゲットの創出につながり大変重要である。がんの浸潤転移は、細胞の上皮間葉変換、細胞外マトリックスの分解、細胞遊走といった複数のプロセスから成るため、文献情報から関連が予想される遺伝子の数は膨大である。従って、その中から浸潤転移抑制の鍵となる遺伝子を探索するには、ハイスループットな評価システムが必要不可欠である。また、がんの浸潤転移はがん細胞の周辺環境に大きく依存することから、各遺伝子の浸潤への影響を正確に解析するには生体内環境下での細胞レベルの実験が不可欠である。細胞の浸潤転移を細胞レベルで評価する手法としては、現在 **Boyden chamber** を用いてマトリゲルへの浸潤性を評価する方法が最も一般的であるが、ハイスループットな解析が困難であり、また、細胞層を含む生体内の浸潤環境とは大きく異なる環境での評価しかできないという問題点もある。そこで、生体内環境に近い擬似血管内皮モデル内でのがん細胞の浸潤をハイスループットに評価し、浸潤に関わる遺伝子を網羅的に探索するシステムの構築を目指した研究を行った。具体的には、我々が開発した細胞アレイ転写技術を用いて、擬似血管内皮モデル内にセルアレイを構築し、アレイ化したがん細胞の浸潤をハイスループットに評価するシステムの構築を目指した。

中間評価以降は、細胞転写技術を用いて細胞マイクロアレイを組織モデル上に転写する技術の開発を実施した。まず、BAM コート基板上でセルアレイ技術を利用することにより、cDNA プラスミドを導入したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の細胞マイクロアレイを作製した。次に、この BAM コート基板上の細胞アレイをコラーゲンゲルや血管内皮モデル上に転写した。その結果、モデル遺伝子である蛍光タンパク質を発現した細胞スポットが、ゲルや組織モデル表面上に確認された (図 3(2)-2A)。同様に、Boyden chamber を用いた検討で転移能が高いことが知られている [4]ラット膀胱がん細胞 NBT-L2b 細胞のアレイを転写した場合も、転写後に蛍光タンパク質の発現が確認された (図 3(2)-2B)。さらに、NBT-L2b 細胞の場合は、培養時間に応じて細胞のスポットが大きく広がり、高い運動性といった細胞固有の特性を失わずに望みの表面上に転写できることも併せて確認された。次に、siRNA を導入した細胞のアレイを転写した場合についても検討した。モデルとして、BAM コート基板上で EGFP に対する siRNA (anti-EGFP siRNA) を EGFP 恒常発現 HeLa 細胞に導入し、コラーゲンゲルや血管内皮モデル上に転写した。その結果、遺伝子発現が siRNA の導入量に応じてノックダウンされることが確認できた (図 3(2)-3)。以上の結果より、BAM コート基板を用いた核酸導入細胞アレイ転写技術が確立できた。この技術は、HeLa 細胞や NBT-L2b 細胞の他にも、高浸潤性のヒト線維肉腫細胞 HT-1080 細胞にも適用可能であった。

血管内皮モデル中に転写したがん細胞の浸潤性を網羅的に評価するシステムの開発についても、初期検討を行った。細胞転写技術を用いて、浸潤性の異なるがん細胞のアレイをコラーゲンゲル中に作製し、そのコラーゲンゲル内での浸潤性を評価した。がん細胞を予め蛍光染色しておくことで、コラーゲンゲル中での浸潤に伴う細胞の拡散を蛍光観察した。3 日間培養後、蛍光イメージャーを用いて細胞スポットを観察したところ、浸潤性の高い HT1080 細胞では蛍光スポットの直径が増大し、浸潤性の低い HeLa 細胞ではスポットの直径に変化は無かった。この結果から、コラーゲンゲル中の細胞スポットの直径を指標に、細胞の浸潤性が評価できることが示された。そこで、核酸導入細胞アレイ転写技術を用いて、マトリックスプロテアーゼの一つである MMP14 に対する siRNA を種々の濃度で導入した HT1080 細胞のアレイをコラーゲンゲル中に作製し、浸潤性を評価した。その結果、siRNA の導入量が増すについて、細胞スポットの拡大が抑制されることが示された (図 3(2)-4)。今後、本研究で開発した評価系を用いて、浸潤抑制 siRNA の網羅的探索が可能であると期待される。

- [1] G. Zhu, L. Reynolds, T. Crnogorac-Jurcevic, C. E. Gillett, E. A. Dublin, J. F. Marshall, D. Barnes, C. D'Arrigo, P. O. Van Trappen, N. R. Lemoine and I. R. Hart: "Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer", *Oncogene*, 22, 3742–3748 (2003)
- [2] A. Albin, Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G.R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski and R. N. McEwan: "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells", *Cancer Res.*, 47, 3239–3245 (1987)
- [3] G. Z. Cheng, J. Chan, Q. Wang, W. Zhang, C. D. Sun, and L.-H. Wang: "Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel", *Cancer Res.*, 67, 1979–1987 (2007)
- [4] N. Nishi, M. Inui, Y. Kishi, H. Miyanaka, and F. Wada: "Isolation and characterization of invasive and noninvasive variants of a rat bladder tumor cell line.", *Jpn. J. Cancer Res.*, 88(9), 831-838. (1997)

3-2-2 がん運動性機能検出デバイス (産総研 RICE (臨海))

固形がんの 8 割を占める上皮系細胞由来のがんが転移するためには、まずがん細胞が細胞間および基底膜への接着性を失い細胞骨格を変化させることで、運動能を獲得することが必須である。そしてがん細胞はプロテアーゼを産生しつつ原発巣から基底膜を破って間質へと浸潤し、さらに

は血管やリンパ管に侵入して全身を循環し、他臓器へ生着して転移巣を形成するという多段階のステップを踏む⁽¹⁾ (図 3(2)-5)。またがん種によって転移場所に指向性に違いがある⁽²⁾ ことなども知られており、多段階のプロセスから成る可変要因が多い現象であると言える。がんの死因の 9 割が転移によっていることを鑑みると、この転移のメカニズムを解明しその抑制剤を上市することは急務であると思われる。

現在までもこの多段階からなる転移の抑制を目指した抗がん剤の開発は行われてきた。しかしながら、浸潤の際に重要な働きを担うマトリックスメタロプロテアーゼを対象とした臨床試験ではその効果を示すことができず、転移抑制をうたった抗がん剤は未だ上市されていない。現在、転移抑制効果も期待できる抗がん剤として血管新生阻害剤以外で現在臨床治験に至っているのは、Src をターゲットとしたダサチニブ、ボスチニブ、サラカチニブと骨転移に限局した転移抑制剤である、デノスマブである⁽³⁾ (図 3(2)-5B)。特にサラカチニブについては、細胞が浸潤していく際の運動を司る装置として重要な接着班を構成する因子である、focal adhesion kinase と Paxillin をバイオマーカーとして治験で用いていることが興味深い。一方、血管新生阻害剤では、FGF や VEGF 阻害剤 (アバスチンなど) をターゲットとした薬剤開発が現在盛んに行われているものの、VEGFR2 に対する抗体 (DC101) や多標的受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブを投与すると腫瘍が縮小するが、腫瘍辺縁で浸潤が認められるとの報告⁽⁴⁾、インテグリン阻害薬の一部は低濃度ではかえって血管新生を亢進させてしまうとの報告⁽⁵⁾、また、この阻害薬により EGFR を介した細胞運動能の増強が起きるとの報告⁽⁶⁾ などがあり、単剤ではなく既存薬との併用の重要性が説かれている。以上のように、まだ有効な創薬ターゲットの同定できていない現状が転移抑制剤の開発を阻む一因であると思われる。

現在までに動物を使った転移モデルなどが構築されているものの、各段階の詳しいメカニズムの解析をする目的には向かない。そこで細胞レベルでもある程度の模倣が可能である、浸潤段階に着目した実験法が各遺伝子の詳細な機能解析や網羅的探索などに用いられてきた。しかしながら、後述するようにそれら実験法ですら多段階のステップによる応答のため結果の解釈が難しく、さらに生体内では起こり得ない現象の影響を考慮しなくてはならず問題とされてきた。そこで我々は注目する生命現象を限りなくそぎ落とし、転移現象を支える基本的な細胞機能と言える「細胞運動」のみに関わる遺伝子をいかにシンプルに評価するかという命題のもと実験法の確立を目指した。

細胞運動には、大きく分けて間葉織遊走、集団的遊走の 2 種の運動様式が知られている。上皮細胞由来のがんは上皮間葉転換 (EMT) を起こすことで、細胞間接着能の低下、細胞の運動能を獲得する。間葉織遊走する細胞は遠隔転移に寄与すると考えられており、実際、昨年になって Sahai らは⁽⁷⁾ マウスに移植された腫瘍塊中での乳がん細胞の運動の様式は一様ではなく、各細胞がばらばらに移動する単独運動 (間葉織遊走) と数個のがん細胞が接着した状態でグループとして移動する集団運動の 2 種類があることを見出した。前者が局所転移・リンパ転移に、後者が血行性転移する傾向があることを報告しており、遠隔転移に関与すると考えられる単独運動をするがん細胞を用いたスクリーニング技術の開発が望まれる (図 3(2)-6 A)。

これまでに細胞運動を評価するための主な従来技術として、損傷治癒法や Boyden chamber 法が知られている^{(8),(9)} (図 3(2)-6 B)。Boyden chamber 法では、細胞が通過できるほどの大きさの穴が空いている膜で上下に仕切られた 2 つのチャンバー間の単独運動する細胞を評価する。具体的には、下方のチャンバーのみに細胞誘引物質を加え、膜を通過した細胞数を計測し、細胞の運動性を評価する。損傷治癒法では、完全に密集した状態の単層培養細胞に引っ掻き傷をつけ、集団遊走する細胞がこの傷を埋める時間を評価するものである。しかしこれら実験系は、細胞運動性を制御する遺伝子の探索や、細胞運動性に変化を与える薬剤の標的タンパク質を探索するスクリーニングをハイスループットに実施するためには不適切である。これら手法は 1 種類の遺伝子を用いた機能解析であっても相反する結果が報告されていることがままあるのが現状である。このよ

うな結果が得られてしまう原因のひとつとして、損傷治療法では移動しているのは front edge の細胞のみで残りの細胞は追従するだけと考えられるにもかかわらず、これらの性質が異なる細胞を混合した状態で評価してしまっているために起きると考えられている。さらに細胞をはがす際に起きる物理的衝撃で細胞の内容物が培養液中に流出するなどの、本来全く別の要因が細胞運動に影響をもたらすことが無視できないといった問題も指摘されている。一方 Boyden chamber 法では、細胞数を計測する作業が煩雑であり、また運動性と重力によりウェルへ移動した細胞の分離評価が難しいため、本法は再現性が極めて低いとされている。さらに細胞が移動している様が観察できないため、詳しいメカニズムの解析は困難である。このようにハイスループット且つ簡便で再現性が高く、単独行動する細胞の運動様式を解析する手法が現状では無かった。

そこで我々は上述のような細胞運動以外の要因に影響を受けず再現が容易であり、且つ単独細胞の運動を評価する細胞運動性評価セルチップ⁽¹⁰⁻¹³⁾を開発した。すなわちスライドガラス上にコラーゲンコートをし、その基板上を高速に単独運動する細胞を顕微鏡で観察するというものである。コラーゲンがあることのみで培養細胞が基板上を運動するため、他の因子の影響を全く受けない。そしてこのコラーゲンコートした基盤に、リバーストランスフェクション技術を用いて siRNA を遺伝子導入試薬とともにアレイ状に固定化することで、多種の遺伝子が持つそれぞれの運動制御能力を 1 枚のスライド上で並列に評価できることが初めて可能となった。siRNA が導入された指標として同時に蛍光プローブが発光するようにデザインされていることから、DNA アレイスキャナー等を用いてデータを取得できる。また蛍光を指標にコンピュータによる細胞の自動認識とトレースの実現が可能であることから、細胞の経時的な観察画像に基づき、細胞の移動度、方向、極性などを含めた詳細な細胞運動性を評価する事も可能である。

本項目 (3-2-2) では、細胞運動評価セルチップの開発と評価、本チップを用いた応用例 (細胞運動に関わるキナーゼのスクリーニング) を報告する。

3-2-2-1 細胞運動評価セルチップの開発と評価

【使用機器、試薬】

siRNA について

QIAGEN の Non-targeted siRNA 及び、GFP-specific siRNA を対照として用いた。Actr3 に対する siRNA (Rn_Actr3_1_HP siRNA 及び Rn_Actr3_3_HP siRNA), Actr2 に対する siRNA (Rn_Actr2_2_HP 及び Rn_Actr2_3_HP), Wasf2 に対する siRNA (Rn_LOC313024_1_HP 及び Rn_LOC313024_3_HP) また Paxillin に対する siRNA (Rn_LOC360820_1_HP 及び Rn_LOC360820_2_HP) は QIAGEN から購入した。

細胞運動評価セルチップ基盤の前処理について

未処理のスライドガラス (Matsunami Glass Ind., LTD., JPN) を室温で一晩 MHDS 処理したものを、アセトン続いて超純水中で超音波洗浄し、乾燥させたものを 0.001% の type I コラーゲンに浸し 37 度で一晩置いた後に、PBS で 2 度洗浄し、作製した。

フィブロネクチンのラベルについて

ローダミンラベルされたフィブロネクチンは EZ-Label™ ローダミンタンパク質ラベルキット (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) を用いて、マニュアルに従って合成した。具体的にはフィブロネクチン (1 mg/vial; Life Laboratory Company, JPN) を BupH™ Borate Buffer 250 µl に溶解した。ローダミン液は、No-Weigh™ Pre-Measured Rhodamine Protein Labeling Regent に DMF を 100 µl 加えて調整した。溶解したフィブロネクチン 100 µl にローダミン液 10 µl を加え混合した。室温で 1 時間静置した後に、Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units に混合液を移し、500 mL の BupH™ Phosphate Buffered Saline で一晩透析した。回収量に応じて PBS を加え、終濃度 2 mg/ml となるよ

う調整した。

細胞運動評価セルチップの作製手順について

Bovine skin 由来のタイプBゼラチンはシグマ (St. Louis, MO, USA) より購入した。pEGFP-N1 プラスミドは、タカラクロンテックより購入した。このプラスミドはEGFPタンパク質を発現する。コントロールとなる non-target siRNA と anti-EGFP siRNA は QIAGEN より購入した。ラット由来の Actr3 を特異的にノックダウンする siRNA、Actr2 を特異的にノックダウンする siRNA、Waf2 を特異的にノックダウンする siRNA、Pax を特異的にノックダウンする siRNA も QIAGEN より購入した。コーティング前の細胞アレイ用ガラス基盤 (スライドガラス) は松浪ガラス工業 (株) (大阪市) より購入した。

まず pEGFP-N1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl および siRNA (20 μM) 7.5 μl に 7.5 μl の DMEM を加える。Lipofectamine 2000™ (Invitrogen corporation, CA) を 2 μl 添加し、得られた混合物を室温にて 30 分静置して脂質-核酸複合体を形成させた。さらにローダミンラベルされたフィブロネクチン (4 mg/ml) 5 μl と 0.1%ゼラチンを 5 μl 加え、ピペッティングを 5 回行い混合し、マイクロアレイ用ミニプリンター (KCS-mini, KUBOTA compus, JPN) 又は 10 μl 用ピペットチップを用いて、トランスフェクション複合体を基板にスポットし、これを遮光シデシケーター内で乾燥させた (図 3(2)-7)。

細胞培養及び細胞運動アッセイ (Motility assay) について

ラット膀胱がん由来の NBT-L2b 細胞は理研セルバンクより入手した。これを MEM 培地 (SIGMA) に 10%胎児牛血清 (MP BioChemicals, Cleveland, OH, USA)、非必須アミノ酸 (Non-essential amino acid ; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA)、ペニシリン+ストレプトマイシン+カナマイシンが含まれた抗生物質混合液 (GIBCO-BRL) を加えた培地で培養した。ヒト子宮頸がん由来の HeLa とヒト繊維芽肉腫由来の HT1080 はアメリカ細胞バンク (ATCC) より入手した。これらの細胞を 10%胎児牛血清、ペニシリン+ストレプトマイシン+カナマイシンが含まれた抗生物質混合液を加えた DMEM 高グルコース培地 (4.5g/L グルコース) で培養した。

細胞は 0.05%トリプシンにて回収したのちに、終濃度 10%の FBS、抗生物質 (ペニシリンおよびストレプトマイシン) を含有する DMEM-F12HAM 培地にて懸濁した。懸濁液を 0.001%タイプ I コラーゲン (Research Institute for the functional peptides, JPN) でコーティングしたガラス基盤 (スライドガラス) に播種 (2-4 x 10⁵ cells / chip) をすることで、細胞運動アッセイ (Motility assay) を開始した。24 時間の培養後、形質転換細胞を得た。位相差画像を取得した後に、5 分おきで 3 時間蛍光画像を Programmable Cellular Image Tracer (Olympus, JPN)にて撮像した。また、播種後 24 時間・48 時間後のスナップショット画像も同装置で撮像した。遺伝子導入効率などの観察は蛍光顕微鏡 (IX-81; Olympus)で行った。得られた画像は、ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) のプラグインであるマニュアルトラッキングで解析し、座標情報を得た。座標情報を元に細胞運動速度を算出し、その速度を対照群のものと同パラメトリック検定を行い比較した。

静止画像の解析

タイプ I コラーゲンでコーティングされたガラス基盤上で細胞を 24 時間又は 48 時間の間、培養し、細胞の位相差像と蛍光画像を取得した。ローダミンの蛍光画像より試薬のプリント領域の中心の座標と EGFP の蛍光を発する細胞の座標を ImageJ ソフトウェアによって計算をした。この座標間の距離をその時間内に移動した距離と仮定し、移動距離を算出した。各データセットは以下の通り : 24 h (n = 57); non-target siRNA, 48 h (n = 61); Pxn-1 siRNA, 24 h (n = 99); Pxn-1 siRNA, 48 h (n = 133); Pxn-2 siRNA, 24 h (n = 91); and Pxn-2 siRNA, 48 h (n = 120)。数を揃えるためにデータ数が少ない方に合わせるために多い方のデータから少ない方のデータ数と同数のデータをランダムに抽出したセットを 1000 個作り、かつパーミュテーションテストも 1000 回施行し検定を行った。

コントロールとして用いた通常のトランスフェクション法について

なおコントロールとして用いている通常のトランスフェクション法において、Lipofectamine 2000™ (Invitrogen corporation, CA) のマニュアルに従ってトランスフェクションを行った。

【研究結果と考察】

1) 細胞運動評価セルチップに用いる細胞の選択について

細胞運動評価セルチップを用いて細胞運動に関わる遺伝子をスクリーニングするためには適切な細胞株を選択する必要がある。単独運動することはもとより、チップという微小空間においては増殖により運動が低下することがネックになる。そこで簡便に高い再現性で細胞を評価するためには、細胞が直線的に運動し且つ十分運動速度が速いことが重要である。そこで、我々は単独運動をする数種類の細胞株 (MDA-MB-231, HT1080, T24, NBT-L2b) について、タイプ I コラーゲンでコートされたディッシュ上でこれらの細胞株の運動の特徴を評価した (図 3(2)-8, 9, 10)。対照として Hela 細胞を用いた。それぞれの細胞株は位相差画像を 5 分ごとに 3 時間取得した。それぞれの細胞運動のスピードは ImageJ ソフトウェアによって解析された。図 3(2)-8 の左図の縦軸 (Cell Speed) は細胞運動が毎分何 μm かを示しており、右図の縦軸 (Net Distance) は、観察した 3 時間の細胞運動の起点から終点までの直線距離 (μm) を示している。その結果、ラット膀胱がん由来の NBT-II の亜株である NBT-L2b 細胞の速度が最も速く、その上直線的に運動する割合が高いことが分かった (図 3(2)-8, 9, 10)。そこで、これを用いてスクリーニングを進めることにした。

2) 細胞運動に関わる遺伝子のスクリーニングについて

図 3(2)-11 は細胞運動評価用セルチップを用いた細胞運動評価の方法論を示している。予めタイプ I コラーゲンでコーティングしたスライドガラスを用意する。続いて、Lipofectamine 2000™、pEGFP-N1 発現プラスミド、siRNA、ローダミンラベルされたフィブロネクチン及びゼラチンの混合液をインクジェット型の細胞アレイプリンター (クボタコンプス社製) によって、スライドガラス面にスポットし、乾燥させた。アレイ状に縦 4 x 横 13 スポット (合計 52 スポット) となるようにスポットを配置した。

次に細胞 (今回の実験では NBT-L2b 細胞) をスライドガラス 1 枚当たり $1-2 \times 10^5$ 個になるようにスライドガラス表面に播種した。適切な時間の培養 (実験によって異なるが 1-48 時間) の後、蛍光顕微鏡を内包した生細胞観察装置 (インキュベーター型画像取得装置、Programmable Cellular Image Tracer: Olympus との試作品) にセットし、3 時間細胞画像を取得、又は、マイクロアレイスキャナー (GenePix 4200A) を用いてスライドガラスの蛍光画像及び位相差画像を取得し、細胞運動の計測を行った。

細胞への遺伝子 (siRNA とプラスミド) の導入は細胞がスライドガラス面に接着した際、その固相面から導入される。ローダミンでラベルされたフィブロネクチンは、他のトランスフェクション試薬と共にスポットされる。よって、ローダミンの蛍光を検出することで、容易にトランスフェクション領域を同定することが可能である。siRNA と EGFP の発現プラスミドである pEGFP-N1 は、同時に導入され、EGFP タンパク質の発現により、細胞が緑色蛍光を示す。よって、我々は、緑色蛍光を示している細胞には、siRNA が導入されたと仮定して解析を行っている。また、EGFP タンパク質の発現によって、細胞の自動認識とトレースが容易になる。

siRNA がトランスフェクションされた細胞の細胞運動に影響を及ぼさない場合、緑色蛍光を示す細胞の運動様式に変化は無く、細胞はローダミンで規定されたエリアから拡散する。しかし、細胞運動を抑制する場合は、細胞はローダミンで規定されたエリア上で留まることになる。細胞の運動のトレース、又はローダミンの蛍光を示すエリアからの細胞拡散を計算することで、容易且つ高速に細胞の運動を評価する事が可能となる。

3) 細胞運動評価セルチップにおける遺伝子発現の抑制条件の決定について

リバーストランスフェクションの最適な条件を決定するため、リバーストランスフェクションにおいて、混合する試薬（プラスミド：pEGFP-N1、siRNA：anti-EGFP siRNA、リポソーム：Lipofectamine 2000™）の比率を変えながら、条件検討を行った（図 3(2)-12）。pEGFP-N1 プラスミド、EGFP 遺伝子の発現を抑制する siRNA、Lipofectamine™ 2000 の混合液の比率を 1:3.5:2 (v/v)、1:7:2 (v/v)、1:10.5:2 (v/v) に調整した 3 種の条件をつくり、リバーストランスフェクションを行った。その結果、どの条件においても、EGFP タンパク質の発現は anti-GFP siRNA によって完全に抑制された。その上、1:3.5:2 (v/v)、1:7:2 (v/v) の条件においては、siRNA による非特異的な発現抑制が観察されなかった。そこで、非特異的な抑制が見られず、且つ siRNA による遺伝子抑制を出来るかぎり強く行うことができた条件である、1:7:2 (v/v) の条件を以降使用することにした。

4) siRNA による細胞運動セルチップ上での細胞運動阻害について

細胞運動セルチップにおいても、導入された siRNA が細胞運動を抑制するかどうかを調査するために、通常のトランスフェクション法とセルチップ上でのリバーストランスフェクション法の両手法を比較した。比較実験のために、我々はポジティブコントロールとなる 4 種類の遺伝子を選定した。すなわち、Pxn (Paxillin)、Actr2 (ARP2 actin-related protein 2 homolog)、Actr3 (ARP2 actin-related protein 3 homolog)、Wasf2 (WAS protein family, member 2) の 4 種である。従来の研究において、これらの遺伝子の発現は細胞運動に関与することが知られており、これらの遺伝子の発現抑制によって細胞運動が阻害されると期待される。我々は 4 種の遺伝子に対してそれぞれ 2 種類ずつの siRNA をデザインした。それぞれの siRNA は NBT-L2b 細胞に導入され、細胞の移動を観察するため、細胞画像を位相差画像を 5 分毎に 3 時間取得した。図 3(2)-13 に示されるように、Pxn をターゲットとする siRNA 2 種の内の 1 つ (Pxn-1) を除いた他のすべての siRNA によって、細胞運動が有意に阻害された。Pxn-1 については、通常のトランスフェクション法においては有意な差が見られなかったが、細胞運動セルチップ上でのリバーストランスフェクション法においては、有意な差が見られた。細胞運動の速度は通常のトランスフェクション法において用いた場合と比較して、セルチップ上の細胞運動速度は全体に 50% 程度低下した。別途実験を行った結果、我々はフィブロネクチンでコートしたディッシュ表面を移動する細胞の速度が、タイプ I コラーゲンでコートしたディッシュ表面を移動する細胞の速度に対して低下することを確認している。それ故、細胞速度の全体的な低下は、セルチップをフィブロネクチンでコートした事が原因と考えられる。

我々は、3-2-2-1 の実験において、細胞の運動をマニュアルで認識・追跡している。本作業は、マニュアルトラッキングを補助する ImageJ ソフトウェアを用いてすら、非常に時間のかかる作業であるため、細胞運動速度を簡易的に評価する手法の開発を試みた。これはタイムラプス画像を用いず、細胞のスナップショット画像から細胞運動を評価する手法である。図 3(2)-14 はリバーストランスフェクション後、24 時間及び 48 時間の GFP を発現する NBT-L2b 細胞の位置を示している。擬似的に 24 時間後の細胞を緑、48 時間後の細胞を赤色で表現している。siRNA による細胞運動への影響を評価するため、遺伝子のプリントエリアの中心からの細胞までの距離をそれぞれ測定し、この値を用いて細胞運動の評価ができるかどうかを調査した。Non-target siRNA を用いた場合、24 時間後と 48 時間後の細胞の位置を比較した所、十分に差が見られた。一方 Pxn をターゲットとする 2 種の siRNA (Pxn-1, Pxn-2) を用いた場合、24 時間後と 48 時間後の細胞の位置に十分な差が見られず、Pxn-1 および Pxn-2 が導入された細胞はほとんど動いていないことが予想された。この手法を用いることで、細胞の運動を簡易的に素早く調査することが可能となった。数は現状で 1 チップ当たり 52 スポットである。スポットの集積度という観点からは、多色のレボ

ータを用いることで集積度の向上が可能と考えており、改良を進める予定である。

3-2-2-2 細胞運動評価セルチップを用いた応用：細胞運動に関わるキナーゼのスクリーニング

【使用機器、物質】

QIAGEN の Non-targeted siRNA 及び、Paxillin に対する siRNA (Rn_LOC360820_2_HP) を対照として用いた。ライブラリーは Rat Kinase siRNA Set Version 1.0 (Qiagen) を用いた。

【実験手順、方法】

細胞の培養について

NBT-L2b (RIKEN BioResource Center; RCB1372)は、37°C、5%CO₂ 下で抗生物質（ペニシリンおよびストレプトマイシン）、終濃度 10%の FBS、0.1mM Non Essential Amino Acid (NEAA)、1mM Sodium pyruvate を含有する MEM 培地にて培養した。

基盤の前処理について

未処理のスライドガラス(Matsunami Glass) を室温で一晩 MHDS 処理したものを、アセトンに続いて超純水中で超音波洗浄し、乾燥させた。PBS で希釈した 0.001%の type I コラーゲン (Research Institute for the functional peptides)に浸し 37 度で一晩静置した後に、PBS で 2 度洗浄し作製した。

フィブロネクチンのラベルについて

フィブロネクチンへのローダミンラベルは EZ-LabelTM Rhodamine Protein Labeling Kit (PIERCE) を用いて同社のプロトコルに従い行った。フィブロネクチン (1mg/vial; Life Laboratory Company) を BupHTM Borate Buffer 250 µl に溶解した。ローダミン液は、No-WeighTM Pre-Measured Rhodamine Protein Labeling Reagent に DMF を 100 µl 加えて調整した。溶解したフィブロネクチン 100 µl にローダミン液 10 µl を加え混合した。室温で 1 時間静置した後に、Slide-A-Lyzer^R MINI Dialysis Units に混合液を移し、500 mL の BupHTM Phosphate Buffered Saline で一晩透析した。回収量に応じて PBS を加え、終濃度 2 mg/ml となるよう調整した。

セルアレイ（トランスフェクションアレイ：TFA）調製について

4µl の DMEM で pCS-Venus(1 µg/µl) 1 µl および siRNA(10 µM)10.5 µl を希釈した。希釈液に 2 µl の LipofectAMINE2000 (Invitrogen) を添加し、得られた混合物を室温にて静置して脂質 DNA 複合体を形成させた。さらに蛍光ラベルしたフィブロネクチン (2 µg/µg)を 5 µl さらに Type B ゼラチン (Sigma) を 5 µl 加え、ピペッティングを 5 回行い混合した。混合液はマイクロアレイプリンター(KCS-mini; KUBOTA compus)にてコラーゲンコートした基盤にスポットし、デシケータ内で乾燥させた。

細胞運動アッセイについて

細胞は 0.05%トリプシンにて回収したのちに、終濃度 10%の FBS、抗生物質（ペニシリンおよびストレプトマイシン）を含有する DMEM-F12 培地にて懸濁した。1st スクリーニングでは、懸濁液を 2~4 x 10⁵ cells/ 1 chip の条件でセルアレイへ播種・24 時間培養し、形質転換細胞を得た。培養後、10 分おきに 3 時間蛍光画像及び位相差画像を 4 倍のレンズを搭載した生細胞観察装置にて撮像した。CellVoyagerTM (Yokogawa Electric Corporation, JPN) 付属のソフトウェアを用いて取得した蛍光画像のトラッキングを行い、座標情報を得た。2nd スクリーニングでは、コラーゲンコートした 24well の EZVIEW®カルチャープレート LB (IWAKI, JPN) に 2 x 10⁴ cells/ 1 well の条件

で細胞を播種し一晩培養した。HiperFect (QIAGEN)1.5 μ l、pCS-Venus(1 μ g/ μ l) 0.2 μ l を加え siRNA の終濃度が 10 nM となるように 50 μ l の混合液を調整した。混合液を 10 分室温で静置した後に、DMEM-F12 Ham で培地交換した細胞へ添加し、24 時間培養した。培養 24 時間後及び 48 時間後の細胞の蛍光画像を取得した後に 5 分おきに 3 時間位相差画像を生細胞観察装置にて撮像した。得られた画像は、ImageJ のプラグインであるマニュアルトラッキングで解析し、座標情報を得た。それぞれのスクリーニングの際に得られた座標情報を元に細胞運動速度を算出し、対照群のものとノンパラメトリック検定を行い比較した。

Real-time PCR について

0.01%のコラーゲンでコートした 24 well ディッシュ (IWAKAI; マイクロプレート浮遊細胞培養用、表面処理なし) に DMEM/F12 Ham で懸濁した NBT-L2b を 3×10^4 cells/well にて播種し、37 $^{\circ}$ C、0.5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。トランスフェクションには HiperFect (QIAGEN) を使用し、HiperFect 1.5 μ l、siRNA の終濃度 10 nM で全量が 100 μ l になるように調整した。10 分室温で静置した後に、DMEM-F12 Ham で培地交換した細胞へ添加し、48 時間培養した。1 well 当たり 250 μ l の Isogen を加え、室温で 5 分静置した後にクロロホルムを 50 μ l 加えた。4 $^{\circ}$ C、15,000 xg、15 分で遠心し、水相を回収し、その 0.8 倍量の 2-プロパノールを加えた。室温で 10 分静置した後、再び 4 $^{\circ}$ C、15,000 xg、15 分で遠心し、沈殿物を 1 ml の 70%エタノールで洗浄した。さらに 4 $^{\circ}$ C、15,000 xg、15 分で遠心し RNA を回収した。RNase Free Water で溶解後、20-100 ng/ μ l に希釈した。One-step PCR には QuantiTect SYBER Green PCR kit (QIAGEN) を使用した。すなわち RT enzyme、2 x Master mix、1 well 当たり 1 μ l の total RNA、1/10 量のプライマーを加えた混合液を調整し、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムを用いて PCR を行った。内部標準としてラットの gapdh 遺伝子を使用した。また、プライマーは QuantiTect Primer assay (QIAGEN) のものを使用した。

【研究結果】

確立した細胞運動性評価チップを用いて、全ラットキナーゼ(738 種)に対する siRNA ライブラリーを用いた細胞運動性評価チップを作成し、細胞運動制御に関わるキノーム解析を行った。キナーゼを標的とした理由は、阻害剤が多く開発されているため評価チップで絞りこんだ遺伝子に対し多面的に評価できる点、またその阻害剤自体をリード化合物として迅速に創薬プロセスへ導入することが可能な点にある。各チップには対照として Non-target siRNA と、3-2-2-1 の検討において一番強い運動抑制効果を示した、Paxillin を標的とする siRNA を用いた。キナーゼ各遺伝子に対しては標的サイトが異なる 2 種の siRNA を用いており、各チップには siRNA ライブラリーより 10 種ずつプリントを行ったため、合計 148 枚の細胞運動評価チップにて 1st スクリーニングを行った。すなわち、NBT-L2b 播種後 24 時間の各スポットの Venus 蛍光画像を 10 分おきに 18 枚取得した。そして 18 枚の画像をつないだ時系列画像を CellVoyager™ 付属のソフトでトラッキングし、その数値データを元に運動速度を対照群と比較し、ノンパラメトリック検定にて平均細胞速度に有意差が見られる物を絞り込んだ。その結果 1st スクリーニングでは、738 種から 49 種の遺伝子が対照と比較してその発現が抑制された際に有意に細胞運動能が低下する遺伝子として単離された (図 3(2)-15)。

次に、絞り込まれた 49 遺伝子に対する 50siRNA を用いて 2nd スクリーニングを行った。2nd スクリーニングでは光毒性による擬陽性の混入を抑制するために、導入 48 時間後の Venus 蛍光画像を撮像した後に、位相差画像を 5 分おきに 36 枚取得した。時系列画像を Image J のプラグインであるマニュアルトラッキングで解析したところ、10 遺伝子が絞り込まれた。さらにリアルタイム PCR を行い、絞り込まれた siRNA の標的遺伝子に対する発現抑制効果を検討したところ、8 遺伝子に対してその抑制効果が確認できた (図 3(2)-16)。結果として、以上のスクリーニングより、

細胞運動に関わることが予想される 8 遺伝子が同定された (図 3(2)-17)。

【考察】

研究の背景でも述べたように、生体内で見られるような細胞外基質に囲まれた 3 次元の空間における細胞の遊走は、間葉織遊走、集団的遊走に大きく分類される。集団的遊走はカドヘリンによる細胞間接着能を保っている細胞が集団で移動する現象であり、乳がん、大腸がん、扁平上皮がんなどによく見られ、移動前の場所と繋がったままシート状に集団で遊走する。このような遊走は生理的にも、上皮組織の発生過程や創傷治癒、血管新生時の遊走に見られる。一方、細胞間接着能は失っているが、インテグリンレセプターを介したコラーゲンファイバーなどの細胞外基質との接着能が残っている単細胞は間葉織遊走 (メラノーマや悪性化した上皮由来がん、ある種の肉腫) つまり単独運動を示す。細胞間接着能も基質との接着能も失っている単細胞はアメーバ様遊走 (小細胞肺がん、スキルスがん、白血病) を示す。

最近、蛍光タンパクでラベルしたラット乳がん細胞である MTLn3E 細胞を乳腺脂肪体にインジェクションしイメージングした結果から、移植された腫瘍塊の 1 割弱の細胞が運動しており、その内訳は集団遊走しているものが 15%ほど、また単独運動しているものが残りを占めていた。さらに、集団的遊走をする細胞集団は同一組織内など近接した領域に転移する一方で、単細胞で遊走するものは異なる組織へ遠隔転移を起こしていることが示されている⁽⁷⁾。つまり、単一の細胞株を用いても遊走の様式は多様であり、かつ単細胞遊走をいかに食い止めるかが、転移によるがんの再発や進行を止めるカギになると思われる。このような背景からも単細胞遊走に関わる遺伝子を同定可能な本細胞チップの重要性がうかがえる。

このチップを用いた検討から絞り込まれた 8 遺伝子 (図 3(2)-17) のうち、まず特筆すべきは transforming growth factor, beta receptor 1 (Tgfb1) であろう。元々 TGFβ のシグナルは上皮間葉転換 (EMT) に関与するとされてきたが、上述のグループらによって単細胞遊走をするためにこのシグナルが重要であることが示されている。既に他のグループにより単細胞遊走に関与することが示唆されている遺伝子が同定できたことは、本スクリーニングの妥当性・有用性を示すことができたと思われる。その他に細胞運動に既に関与することが報告されていた遺伝子として、浸潤性の乳がんの 20~40%においてその体細胞変異が見られている gene36 や、細胞骨格調節因子である、gene22 が絞り込まれた。また、細胞損傷治癒法によるスクリーニングで運動能が低下したとの報告のある、gene12 も絞り込まれた。さらに、細胞運動との関連は報告されていないが各種がんにおいて発現が亢進している、gene16, gene42 も同定された。Gene39, gene43 については機能未知である。今後は、細胞骨格や接着斑などを可視化できるプローブを Venus 発現ベクターの代わりに上述の siRNA とともに導入し、タイムラプス画像の解析を通してそれら遺伝子の機能について詳細な解析を行う予定である。

先行して siRNA を用いた細胞運動関連遺伝子のスクリーニングとして、Brugge らのグループの仕事が挙げられる⁽¹⁴⁾。彼らは、損傷治癒法をベースとしたスクリーニングを展開しており、その運動様式は上述の集団遊走にあたる。一般的に集団遊走と単細胞遊走に関わるシグナル伝達経路は主に Rac/WAVE2/Arp2/3 系と同一の経路で行われるとされるが、彼らの結果と比べたところ我々の 1st スクリーニングで絞り込まれた 1 遺伝子と重複するのみにとどまった。上述のように単細胞遊走特異的な遺伝子も同定されていること、また損傷治癒法の場合は直接細胞運動制御に関わらない遺伝子も同定されやすい方法であることなどから、これらの結果を考察するにはさらなる検討が必要であると思われる。

- (1) Joyce JA and Pollard JW: "Microenvironmental regulation of metastasis.", Nature Reviews Cancer. 2009 Apr;9(4):239-52.
- (2) Psaila B and Lyden D: "The metastatic niche: adapting the foreign soil.", Nature Reviews Cancer. 2009

Apr;9(4):285-93.

- (3) 製薬協 HP より (<http://www.jpma.or.jp/medicine/shinyaku/development/index.html>)
- (4) Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D and Casanovas O: “Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis.”, *Cancer Cell*. 2009 Mar 3;15(3):220-31.
- (5) Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC and Hodivala-Dilke KM: “Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors.”, *Nature Medicine*. 2009 Apr;15(4):392-400.
- (6) Caswell PT, Chan M, Lindsay AJ, McCaffrey MW, Boettiger D and Norman JC: “Rab-coupling protein coordinates recycling of alpha5beta1 integrin and EGFR1 to promote cell migration in 3D microenvironments.”, *Journal of Cell Biology*. 2008 Oct 6;183(1):143-55.
- (7) Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS and Sahai E: “Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility.”, *Nature Cell Biology*. 2009 Nov;11(11):1287-96.
- (8) Nobes CD and Hall A: “Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement.”, *The Journal of Cell Biology*. 1999 Mar 22;144(6):1235-44.
- (9) Boyden S: “The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.”, *The Journal of Experimental Medicine*. 1962 Mar 1;115:453-66.
- (10) 藤田聡史、長崎晃、三宅淳、長崎玲子、三宅正人「細胞運動性評価セルチップ」, 特開 2008-295351
- (11) Onuki-Nagasaki R, Nagasaki A, Hakamada K, Uyeda TQ, Fujita S, Miyake M and Miyake J: “On-chip screening method for cell migration genes based on a transfection microarray.”, *Lab on a Chip*. 2008 Sep;8(9):1502-6.
- (12) Onuki-Nagasaki R, Nagasaki A, Hakamada K, Uyeda TQ, Fujita S, Miyake M and Miyake J: “Transfection microarrays for high-throughput phenotypic screening of genes involved in cell migration.”, *Methods in Molecular Biology*. 2010;629:193-203.
- (13) 長崎晃、長崎玲子、藤田聡史、上田太郎「細胞運動関連遺伝子群のゲノムワイドスクリーニング法の開発」 *生化学* 2009 May;81(5):381-6.
- (14) Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, Khvorova A and Brugge JS: ” Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach.”, *Nature Cell Biology*. 2008 Sep;10(9):1027-38.

3-3 低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発 (東京大学 鷲津研)

微細加工により作られたオリフィスアレイを持つシート上に細胞を配置、そのオリフィスの作る電界集中を積極的に用いて個々の細胞の膜にかかる電圧を制御し、高収率・低侵襲のエレクトロポレーションを行う装置 (図 3(3)-1) を開発することを最終目標とし、中間評価までに、絶縁薄膜に開口したオリフィスに固定した細胞周囲の電界解析の手法を開発し、電界集中型エレクトロポレーションの最適化を行うとともに、この方法によって細胞にリアルタイムで物質が導入できることを、比較的分子量である蛍光性の色素・タンパク等を用いて実証した。

中間評価において指摘された遺伝子導入効率の定量性、および低分子化合物導入を含めた実用化の見通しに関し、その時点で、①低分子は問題なく入るが、プラスミド等の高分子はそれと比較して入りにくい、②プラスミド等の高分子は、単層で扁平に付着している細胞には入りにくい、積層していると発現が多く見られる、などの現象が見られ、また、③10×10程度のオリフィスアレイを用いて実験を行ってきたが、実用のためにはより大量並列化が望ましい、という問題点があった。そこで、a)物質導入過程の解析とそれに基づいたオリフィス形状・導入条件の最適化、b) エレクトロポレーション後の長期培養と細胞侵襲性の評価、c)大量オリフィスの実用的作製法の開発、を行った。

まず、エレクトロポレーションによって細胞に形成されるポアを通じた物質移動の解析を行うことにより、i) 低分子は拡散により容易に細胞内に入るが、プラスミド等の高分子は拡散のみでは十分でなく、直流成分を持つパルス印加することにより電気泳動の効果を援用するのが効果的である、ii) その場合でも、扁平な細胞においては、一旦入ったプラスミドが突き抜けてしまう恐れがあるが、細胞周囲の導電率を下げれば、細胞内での電界が弱くなり泳動速度が下がるので、このような突き抜けを防ぐことができる、などの予想をたてた。次に、これらを実験的に検証したところ、理論通りの導入効率の向上が得られ、不要に過大な電圧を印加することなく導入が行えるため、細胞にもほとんど侵襲を与えないことが判明した。また、これらの実験により、a) プラスミドが電気泳動により核に直接導入されることが遺伝子の発現のために必要であるらしいこと、b) 細胞によっては3μm程度の大きさのオリフィスに入り込んで生存性が低下すること、などが見いだされた。これらの結果に基づき、最適な直径・ピッチを持つオリフィスアレイの設計法が確立されたので、フォトリソグラフィにより数十万個のオリフィスアレイを持つチップを作製する方法の開発を行った。

従来のエレクトロポレーションは、細胞の集団を対象として、その種類に応じて経験的に決められた電気条件を用いて行ってきたが、上記の一連の結果は、細胞1個レベルで物質導入過程をきちんと評価し最適化を行うことにより高収率・低侵襲の物質導入が行えることを示したもので、経験則によらない再現性のよい安定した技術を確立したものと評価される。

【科学的視点】

オンチップエレクトロポレーションは、MITやUC Berkeley等においても研究が行われていた[1-2]が、チップ上の位置が特定された細胞に物質を導入することが主眼におかれ、誘起される膜電圧や穿孔時の物質移動などの適正な評価・最適化が行われておらず、単にエレクトロポレーション手法の実証に終わり、再現性の良い遺伝子発現を行うには至らずに終了した模様である。また、これらの研究において用いられていたチップは高度な微細加工を必要とし、構造が複雑であるため、チップ中での細胞の長期培養が困難であった。本プロジェクトは、簡単で長期細胞培養に適した構造を用い、数V程度の低電圧で低侵襲に安定的にプラスミドを導入する実用的技術としてのオンチップエレクトロポレーションを確立したものとして評価される。

[1] Y. Huang and B. Rubinsky: "Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization", *Sensors and Actuators, A*, vol. 89, 242-249 (2001)

[2] M. Khine, A. Lau, C. Ionescu-Zanetti, J. Seo and L P. Lee: "A single cell electroporation chip", Lab. Chip 5 pp.38-43 (2005)

【技術的視点】

既存のセルアレイ技術は、細胞の固相への接着とリポフェクション技術とを組み合わせられた方法であるため、a) 浮遊系細胞や弱接着依存性細胞への適用は困難である、b) 細胞種により取り込みが生じやすいものと生じにくいものがある、などの問題があった。本研究で用いたエレクトロポレーション法は、細胞種によらず細胞膜電圧が約 1V で穿孔が生ずることを利用して細胞内に物質を導入する方法で、細胞種を選ばずに、指定したタイミングで細胞内に物質導入を行うことができる。従来、エレクトロポレーション法は、細胞傷害性が高いと言われていたが、本研究では、この原因が穿孔に必要な電圧より過大な電圧が細胞膜にかかってしまうことにあることを明らかにし、電界集中を用いて膜電圧を精密に制御すれば細胞に対する侵襲性が問題にならないことを、エレクトロポレーション後の細胞のチップ上での数世代にわたる長期観察により実証した。

また、ここで開発したチップの構造は、オリフィスシートを 2 枚の基板で挟み込んだ形をしており、すべてローコスト・ディスプレイ化可能である。物質導入後に上側基板を取り外せば、通常のディッシュと同等の培養環境となる。構造が単純であるので、現在のセルアレイの構造にあわせてシート・基板を作製することは容易である。従って、電界集中法を用いた低侵襲性エレクトロポレーション法の確立は、エレクトロポレーション技術のセルアレイへの応用を可能にする成果である。

エレクトロポレーションの手法は、エンドサイトーシス等の細胞の持つ性質に依存しない方法であるので、従来のリポフェクション等では遺伝子導入困難な細胞（たとえば間葉系幹細胞）にも遺伝子導入が可能であり、加えて、遺伝子のみならず、化合物・タンパク・RNA 等の分子も、特定のタイミング（パルス印加時）で特定の細胞（オリフィスの上にある細胞）に導入し、導入された個々の細胞の経時変化を追跡できるので、低分子化合物との相互作用時系列解析のハイスループット化のための技術としての展開も期待される。

技術的には成熟しており、すでに企業と協同して市場化できる段階にある。この時の問題点は、技術自体ではなく、製薬等の分野におけるニーズの掘り起こしを通じた販路の確保にあると予想される。

【研究成果】

遺伝子の導入と、その後数日にわたるチップ上での培養により遺伝子発現を実証することを主目標として研究を行った。その結果、次の点が解明・実証された。

- 1) この手法で用いるパルス電圧の波高値は 2-3V 程度の低電圧であるため、細胞に対する侵襲はほとんど問題にならない。
- 2) 数十 kD 程度の低分子物質、たとえばタンパクは、エレクトロポレーションにより形成されたポアを通じて拡散により細胞内に入る。一方、プラスミドなど分子量の大きいものは拡散のみでは入りにくい。しかし、直流成分を持つ比較的長いパルス（たとえば 100ms）を用いれば、電気泳動効果により細胞内にプラスミドを導入することができる。
- 3) 電気泳動効果によるプラスミドの導入過程の理論解析を行い、導入を効率的に行うためのオリフィス径・オリフィスピッチ・印加電圧・電極材料・バッファー塩濃度の最適化を行った。特に、扁平な細胞に対しては、バッファーの導電率を下げ、電気泳動による濃縮を行わせることが有効であることが判明した。
- 4) リポフェクション法によるプラスミド導入発現効率が 1%未満程度と低い MSC 細胞（間葉系幹細胞）を用いて、20-30%の GFP の発現収率を得た。

- 5) プラスミドが電気泳動効果により核に到達することがその発現のために必要であり、オリフィスが核の直下にある場合にはパルス印加から 2 時間ほどで GFP の発現が生じる。
- 6) 上記の知見に基づき、平均的な核の大きさの範囲内に 1 個程度のオリフィスがくるようにオリフィスピッチを最適化した数千個のオリフィスを持つオリフィスシートの製造技術を開発した。
- 7) プラズマ処理およびタンパク質コーティングによってオリフィスシート表面を改質後、細胞膜アンカーリング試薬 (Biocompatible anchor for membrane: BAM) を修飾する方法を開発した。
- 8) BAM 修飾オリフィスシート上に浮遊系細胞である K562 細胞 (骨髄性白血病細胞) を固定化後、上記の技術を用いて EGFP 発現プラスミドを導入し、EGFP の発現を確認した。

以上により、接着細胞、浮遊細胞の両タイプの細胞に適用することが可能なセルアレイが開発できた。以下にこれらの詳細を示す。

図 3(3)-2 は、本エレクトロポレーション法により 1.5V のパルスを用いて HeLa 細胞に GFP タンパクを導入した 20 時間後の蛍光像で、蛍光タンパクを細胞質に含む細胞が付着分裂を始めていることから、本法が低電圧・低侵襲であり、数十 kD 程度の低分子物質を容易に導入可能であることを示している。

プラスミド導入に関しては、まず、縦 10 個×横 10 個程度のオリフィスアレイを用い、マウス繊維芽細胞 (L929)、膵臓β細胞 (MIN6-m9)、間葉系幹細胞 (MSC)、培養心筋細胞 (H9c2)、ヒト表皮繊維芽細胞 (LDF) 等への GFP プラスミドの導入を試み、発現率の評価を行った。その結果、L929 > MIN6 > MSC ≈ H9c2 ≈ LDF の順で発現が生じやすく、MSC・H9c2・LDF では発現率が数%以下であること、また、初期播種密度が高い方が比較的導入率が高いということがわかった。

エレクトロポレーションは、細胞膜の可逆的膜破壊を用いる物理的手法であり、膜の破壊電圧は細胞種にほとんど依存しないはずなので、このような細胞種による差異は、細胞の形状・オリフィスとの相対位置などの物理的条件に帰着されるはずである。そこで、エレクトロポレーションにより穿孔される細胞膜上のポアを集中抵抗で近似する電氣的等価モデルにより解析を行ったところ、扁平な細胞に対しては、電気泳動により細胞内に導入されるべきプラスミドが、細胞をつきぬけてしまうという結果が得られた。上記の MSC 細胞等は、特に低播種密度でオリフィスシート上で扁平に広がるので、このことが低い発現率の原因となっていると考えられた。また、同様の解析により、細胞に導入されたプラスミドの一部は電気泳動により核膜孔を通して核内に導入されることも予測された。

プラスミドのつきぬけを防止し、細胞内に滞留するプラスミド数を増やすため、導電率の低い媒質 (細胞外溶液) を用いる方法を考案した。すなわち、電流密度は導電率と電界強度の積であるので、細胞外の導電率が低ければ、細胞内の電界は細胞外のそれよりも低くなり、プラスミドの泳動速度が下がり、細胞内に滞留する個数が増えることになる。

また、扁平に伸展しやすい細胞は、オリフィスの中に入り込もうとする結果、生存率が下がるという、表面の幾何学的形状に起因する問題も明らかになった。そこで、オリフィスにゲルを充填し、細胞培養を行う面を平坦化することとした (図 3(3)-3)。ゲルの充填は、オリフィスシートをプラズマ処理により親水化し、片方からゲル溶液を滴下することにより、毛管現象を利用して行った。

図 3(3)-4 は、上記の低導電率溶液の使用・ゲル充填を行って間葉系幹細胞に対する遺伝子導入を行った結果で、播種した細胞に対し 40%程度の発現率が得られている。かつ、このような実験における観察から、核がオリフィス直上にある場合には GFP 発現がプラスミド導入 2 時間程度から生じることが判明した。この結果は、上記のように、電気泳動により核膜孔を通して核内にプ

ラスミドが導入されることによると思われる。この結果から、平均的な核の大きさの範囲内に1個程度のオリフィスがくるようにオリフィスピッチを選択すべきであるという設計指針が得られた。

図 3(3)-5 は、核あたり 1 個以上のオリフィスが来るような、オリフィス径 2 μm 、開孔率数%程度のメンブレンフィルターをオリフィスシートとして用いて、間葉系幹細胞に GFP 遺伝子導入をした時の一例で、20~30%の発現率が得られている。また、ほとんどの細胞がカルセインで染色されることより、細胞がエレクトロポレーションによるダメージを受けていないことがわかる。なお、このフィルターは孔の配置がランダムであり、また密度にもばらつきがあるので、導入率の一様性が低いですが、上記 6)で開発したオリフィスシートの利用によりさらに良い結果が期待される。

また、図 3(3)-6 は、BAM 修飾オリフィスシート上で浮遊系細胞である K562 細胞に蛍光タンパク質の遺伝子を導入した時の顕微鏡画像の一例であり、まだ発現率は低いですがオリフィス上の細胞でタンパク質発現が確認できた。この結果は、上記 6)の技術を開発する前の成果であり、今後、改良されたオリフィスシートの利用により、発現率の向上が期待される。

3-4 遺伝子発現の同期化技術の開発 (東京大学 長棟研)

細胞機能は、その機能に関与する遺伝子群が時系列的に発現、あるいは発現抑制されることによって制御されている。従って、細胞の機能発現メカニズムを理解するには、遺伝子ネットワークの網羅的な時系列解析が必要である。東京大学(三宅研)では、遺伝子発現の起点となる細胞周期を見出すことで、計算科学的なアプローチでの時系列解析法の開発を行った。一方、東京大学(長棟研、鷺津研)では、実験科学的なアプローチでの時系列解析法の開発を試みた。具体的には、光分解性保護基を修飾したケージドプラスミドを用いて、細胞マイクロアレイ上で遺伝子の発現量と発現のタイミングを光制御する技術の開発を行った。中間評価までに、細胞に優しい微量な光で分解可能な既存の光分解性保護基の誘導体の合成方法を確立し、この保護基を導入したリン酸化ペプチドを用いて細胞機能(イノシトールリン脂質 PIP3 生産)が光制御できることを確認した。また、この光分解性保護基を cDNA プラスミドにランダム修飾し細胞内に導入したところ、遺伝子発現を光活性化できることは確認された。しかしながら、光活性化効率は低く、細胞毒性のある強い光を照射する必要があるがあった。

中間評価以降は、光分解性保護基を部位特異的にプラスミドのプロモーター配列に導入した部位特異的ケージドプラスミドの開発を行った。細胞マイクロアレイ上で遺伝子発現を光制御するためには、細胞毒性の無い弱い光で活性化できる新しいケージドプラスミドが必要である。本研究で研究した部位特異的ケージドプラスミドは、プラスミド上の一箇所にだけ保護基が修飾されているため、弱い光でも十分に分解して光活性化されると考えた(図 3(4)-1A)。

まず、cDNA プラスミドのプロモーター配列特異的にビオチン化光分解性保護基を導入した部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドの開発に成功した。ゲルシフトアッセイによって、このプラスミドのプロモーター配列にストレプトアビジンが結合し、光照射によって脱離することも確認された。そこで、この部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドを細胞内に導入したところ、ストレプトアビジンを結合させて導入した場合は、遺伝子発現が抑制された。次に、この導入した細胞に光照射したところ、細胞毒性の無い弱い光量で、抑制された発現量の約 75% を回復することに成功した。しかし、保護基による光照射前の遺伝子発現の抑制が完全ではないため、遺伝子発現の同期化技術としては、不十分であるのが現状である。

今後の研究によって、保護基による遺伝子発現の抑制がより厳密に行うことができれば、光毒性の問題は本手法によって解決したので、細胞マイクロアレイ上での特定遺伝子の発現量と発現のタイミングが光制御できるようになる。従って、特定遺伝子の発現が細胞内現象に与える影響をハイスループットに時系列解析することが可能となり、遺伝子ネットワークのダイナミクスの理解に役立つと考えられる。

【科学的視点】

細胞の機能発現の制御は、その機能に関与する遺伝子群が時系列的に発現、あるいは発現抑制されることによって達成されている。このような遺伝子群の時系列的発現制御の相互作用プロセスを対象として、システムバイオロジー分野では、遺伝子ネットワークのダイナミクスに対する計算科学的な解析やシミュレーションが盛んに行われている [1]。それらのシミュレーション結果の妥当性を検証する上で、細胞内の特定遺伝子の発現を時系列的に行ったり、その発現のタイミングに摂動を与え、その影響を網羅的に調べる実験科学的アプローチが必要不可欠である。本研究で開発する技術は、特定遺伝子の発現量と発現のタイミングを光によって制御することによって、細胞の表現型を指標に遺伝子発現が細胞内現象に与える影響をハイスループットに時系列解析できる点に大きな価値があり、遺伝子ネットワークのダイナミクスの理解を深める強力なツールとなると期待できる。

【技術的視点】

細胞マイクロアレイ上で遺伝子発現を制御（同期化）する技術として、制御に用いる刺激が細胞に与える影響が少ないこと、また、時空間的に精密にコントロールできる刺激であることが不可欠である。Tet-On システム[2]など、小分子リガンドを用いた遺伝子発現制御系が近年広く用いられているが、チップ上の特定の細胞マイクロクラスターにのみ小分子リガンドを作用させるのは技術的に困難である。本研究で用いた光分解性保護基は、時空間的な分解能が非常に高い光刺激に応答可能であることから、細胞マイクロアレイ上での外部刺激操作に適している。しかしながら、既存のケージド核酸は、遺伝子発現の制御に細胞毒性のある強い光照射が必要であるため、改良が必要であった。今回開発した部位特異的ケージドプラスミドは、従来法よりも弱い光で遺伝子発現を誘導可能であるため、実用化技術として価値が高い。また、mRNA への転写のみならず、shRNA や RNA アプタマーへの転写も同様に光制御できる技術であるので、目的遺伝子のノックダウンや目的タンパク質の活性阻害なども望みのタイミングで制御できるようになると期待される。

[1] S. Tavazoie1, J. D. Hughes, M. J. Campbell, R. J. Cho and G. M. Church: "Systematic determination of genetic network architecture", *Nat. Gene.*, 22, 281–285 (1999)

[2] M. Gossen and H. Bujard H.: "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5547–5551 (1992)

【研究成果】

中間評価以降は、部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドの調製技術（部位特異的ケージング法）を開発した（図 3(4)-1 A）。まず、ビオチン化ケージング試薬の設計・合成を行った。次に、PCR 法を用いて、cDNA プラスミドのプロモーター配列特異的に合成したビオチン化光分解性保護基を導入し、部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドの開発に成功した。ゲルシフトアッセイによって、このプラスミドのプロモーター配列にストレプトアビジンが結合し、光照射によって脱離することも確認された。そこで、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）発現プラスミドをモデルプラスミドとして、プロモーター配列特異的ビオチン化ケージドプラスミドを調製し、無細胞タンパク質発現系（PURESYSTEM）を用いて、タンパク質発現の光制御が可能であるか調べた。その結果、ストレプトアビジンを結合したケージドプラスミドを PURESYSTEM 反応溶液に加えた際、コントロールの未修飾プラスミドと比較して、タンパク質発現量が 53 %まで抑制されることがウエスタンブロットによって確認された（図 3(4)-1 B）。次に、このケージドプラスミドに光照射を施した場合、光の照射量に応じて発現量が増加し、照射量 4.0 J/cm^2 の際に、コントロールとほぼ同程度の発現量が確認された（図 3(4)-1 B）。従って、今回開発した部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドを用いることにより、遺伝子発現を 50~100 %の間で精密に光制御することに成功した。

次に、部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドを用いて、細胞内での遺伝子発現制御を試みた。緑色蛍光タンパク質（EGFP）発現プラスミドをモデルプラスミドとして、プロモーター配列特異的ビオチン化ケージドプラスミドを調製し、HeLa 細胞に導入したところ、ストレプトアビジンを結合させて導入した場合、蛍光タンパク質の発現が大きく抑制された（図 3(4)-2）。次に、この部位特異的ケージドプラスミドを導入した細胞に光を照射したところ、細胞毒性が無い非常に弱い光量（ 0.48 J/cm^2 ）で、抑制した発現量の約 75 %を回復することに成功した（図 3(4)-1 B）。以上の結果から、ビオチン化光分解性保護基を介してプロモーター配列上にストレプトアビジンが結合することによって、その立体障害によって転写因子のプロモーター配列上への結合が抑制されて EGFP の発現が低下したこと、また、光照射によるビオチン化光分解性保護基の分解・脱離に伴ってストレプトアビジンが脱離し、EGFP の発現が回復したことが考えられる。このように、タンパク質の立体障害を利用したケージド化合物は他に報告例は無く、非常にユニークな技

術が開発できた。

細胞内での部位特異的ケージドプラスミドの光活性化（光同期化）について、本プロジェクトで開発した実時間蛍光顕微鏡観察システムを用いてリアルタイムモニタリングを行ったところ、光照射後 6 時間で蛍光タンパク質の蛍光が急激に増加する細胞の存在を確認することができた。しかし、保護基による光照射前の遺伝子発現の抑制が完全ではないため、遺伝子発現の同期化技術としての課題が確認された。今後、保護基修飾場所の再検討や保護基の立体障害性の増強、などを行い、遺伝子発現を完全に抑制することが望まれる。本研究によって、光毒性の問題は解決できたため、チップ上で遺伝子発現量を時空間的に光制御できるシステムの構築へと大きく前進したと考えられる。

第4章 応用研究

4-1 創薬の現状および、ハイスループットの限界点

従来がん化学療法で使われてきた、代謝拮抗剤、細胞分裂阻害剤（微小管作用薬）、DNA合成阻害薬、植物アルカロイド等の抗がん剤は、がん細胞に対する細胞毒性を指標にして見出されてきた化合物であり、がんの無限増殖に伴うDNA合成や細胞分裂を阻害することにより、細胞増殖が盛んな細胞に対する殺細胞活性によって薬効を発揮する。これらの抗がん剤によって、白血病などいくつかの悪性腫瘍においては治癒や延命効果が認められるものの、その他大部分のがんにおいては、一時的な腫瘍縮小効果が認められたとしても、十分な延命効果は期待できず、さらには強い副作用を有する薬剤も少なくない。これは、従来の抗がん剤が、がん細胞の増殖を選択的に阻害するメカニズムで薬効を示す訳では無いことや、がんという疾患が、無限増殖や細胞死からの逸脱という一つの概念で括れるものではなく、がんが多様な個性をもっていることに起因すると考えられる。

1980年代中盤以降のがんの分子生物学の進展によって、がん細胞により高い選択性を持ち、副作用が少ない薬剤を目指して分子標的薬の研究が行われてきた。さらに、ヒトゲノムの解析が進み、細胞のがん化、増殖、アポトーシスからの逸脱等に関係する遺伝子の同定やその機能解析から、個々のがん細胞の異常増殖や細胞死誘導関わる標的候補分子を同定し、それに対する選択的な薬剤を創薬としていくという“ゲノム創薬”のコンセプトが登場した。その流れの中で、製薬企業は精力的に分子標的薬の創薬研究を行い、その結果として、慢性骨髄性白血病（CML）の原因遺伝子である Bcr-Abl を阻害するキナーゼ低分子阻害剤グリベックなど、既存の非特異的な細胞毒と異なる標的分子とメカニズムを有する薬剤が標準治療薬としての治療効果や患者の QOL 向上に貢献するようになってきた。

しかしながら、数多くの分子標的薬が開発ステージあるいは臨床現場に登場してくるにともなう、当初の理想とは異なる問題点や限界も明らかになってきている。第一に、単一遺伝子の阻害による薬効の限界が挙げられる。CMLの原因遺伝子である Bcr-Abl 転座産物を標的としたグリベックは、単剤で慢性期 CML 患者に対する奏効率 90% 以上という劇的な効果により CML の標準治療体系を変えるほどの影響を及ぼしたが、むしろそのような分子標的薬はレアケースであり、その他多くの分子標的薬は既存の細胞毒性型の抗がん剤との併用で開発されている。第二に、非感受性患者や耐性獲得患者の問題がある。分子標的薬は選択的に標的を狙うが故に、その分子に異常がある患者には効果があるが、そうでない患者は非感受性であることが想定される。また、標的に合致した患者を選択して選択的な分子標的薬で治療したとしても、標的分子そのものの耐性変異、標的分子の増殖シグナルとは異なるバイパス経路の活性化などによって非感受性となったり、治療の過程で耐性が出現するという事実も明らかになってきている。分子標的薬の成功例とされるグリベックでさえ、標的分子である Bcr-Abl にグリベック耐性の遺伝子変異により耐性化することが明らかになっている。また、大腸がんに対する抗体医薬として開発された EGFR 抗体（セツキシマブ）の場合にも、EGFR パスウェイの下流に存在する K-ras に活性化変異がある患者には上流の EGFR を阻害しても効果が得られないことが臨床試験で明らかとなり、k-ras 変異の無い患者のみに投与される薬剤として使われている²⁾。分子標的薬の効率的な創薬を目指す上では、感受性（非感受性）バイオマーカーを設定して薬剤開発や市販後の患者選択を行うことが重要なポイントであり、分子標的薬時代の“critical path”として、米国 FDA の答申でも重要課題として掲げられている項目である¹⁾。

グリベックやセツキシマブに代表される分子標的薬の多くは、がん細胞増殖に直接関与する分子を標的としており、細胞の増殖停止や細胞死誘導をアウトプットとしている点では既存抗がん剤と同様である。一方、次世代の分子標的候補として、がんの転移・浸潤、細胞分化、腫瘍環境、腫瘍免疫、がん幹細胞等などの細胞機能に着目した創薬も一つの流れとなってきている。

このような新しい分子標的の探索においては、より複雑な細胞機能の組み合わせ（増殖、転移・浸潤、細胞分化、腫瘍環境インターアクション、腫瘍免疫、がん幹細胞）について、細胞全体として起こっている現象を解析していく技術の重要性が増してきている。また、画期的な技術として登場した RNA 干渉（siRNA、shRNA）も新たな創薬標的探索において大きなインパクトをもたらすことが期待されている。ヒトゲノムに相当する siRNA ライブラリーが作られ、理論的にはこれまで見い出せなかった標的を網羅的にスクリーニングすることが可能と考えられている。この RNA 干渉技術を創薬に応用していく際にも、細胞全体でおこる現象の理解が必須である。すなわち、RNA 干渉は細胞内で起こる現象であり、ある特異的な遺伝子をノックダウンして得られる影響は、細胞の増殖阻害やその他の表現系、あるいは細胞内シグナルや遺伝子発現の変動をみて解析していく必要がある。

また、このような次世代分子標的薬のスクリーニングは、これまでに製薬会社が行ってきたような、単離したタンパクや酵素を用いた大規模ハイスループットスクリーニングの時代から、細胞増殖をはじめとした細胞機能に関与する細胞内シグナル経路（パスウェイ）上の分子を標的群と考える“Pathway-driven drug discovery”³⁾や、細胞そのものを用いて複数の機能や表現型を指標として阻害剤を探索する“Multi-parameter phenotypic 創薬”⁴⁾の時代へシフトしている。単離した標的分子やその下流、上流のシグナルのみではなく、それらが相互作用する細胞そのものを扱い、その中で起こっている現象を理解する方法論が重要になっている。

現行の抗がん剤治療では、単剤での効果の弱さや耐性出現の問題を克服するために、多剤併用、あるいは放射線治療等を組み合わせた集学的治療法が中心的な役割を果たしている。また前述のように、近年登場してきた分子標的薬についても、依然として既存抗がん剤との併用での臨床開発が主要な位置を占めている。また、今後転移やがん幹細胞を狙った次世代分子標的薬が登場したとしても、既存化学療法の抗がん剤をベースとした多剤併用が視野に入れられていることに変わりはない。増殖が盛んな腫瘍本体を細胞毒タイプの抗がん剤で叩きながら、別の分子標的薬で転移・浸潤を抑制したり、既存の抗がん剤のみでは治療抵抗性によって残ってしまう腫瘍環境ニッチに残存するがん幹細胞等のポピュレーションを異なる分子標的で叩くなど、既存抗がん剤や分子標的薬を組み合わせた併用療法トータルとして治療効果が期待されている。

しかしながら、前述の単剤での分子標的薬の開発や臨床における感受性や耐性のバイオマーカーと比較して、既存抗がん剤やその併用でベネフィットが得られる患者を選択するバイオマーカーの研究については、まだ発展途上と言わざるを得ない。例えば、抗がん剤の多剤併用カクテル療法は、臨床現場においてがん組織の病理学的特長をある程度の指標としながらがん種ごとのレジメンが確立されてきたが、がん細胞への効果と副作用発現のウィンドウに様々なバリエーションのある患者が、画一的な治療を受けているがために、効果が得られる患者が存在するものの、一方では副作用の方が強く出てしまう患者も含まれており、抗がん剤治療が適応される患者全体としてのベネフィットが必ずしも高い確率では得られていないのが現状である。

先にも述べたとおり、分子標的薬においても依然として標準療法との併用や分子標的薬同士の併用組み合わせによる開発が今後も主流を占めていくと予想される。個々の分子標的薬については、想定した分子標的やその上流、下流因子のプロファイルをバイオマーカーとして使用して、患者の選択や薬剤の効果確認を行う試みが進んできているが、既存抗がん剤との組み合わせ、あるいは今後進んでいくであろう複数の分子標的薬を組み合わせる場合のラショナルやバイオマーカーについては未開拓の分野である。

一部の抗がん剤においては、標的分子や耐性因子の発現や薬物代謝の個人差などのサイエンスに基づいたバイオマーカーが設定され、効果が期待できる患者のみを選択して薬剤が使用される時代が到来している。この動きが他の多くの薬剤にも広がり、適切な薬剤の適切な患者への処方（right drugs for right patient）が、今後理想とされるオーダーメイド医療の姿と考えられる。

乳がんの分野ではホルモン療法等の治療を受けた患者が、再発を防ぐための全身化学療法（ア

ジュバンド治療)を受けるか否かを予後因子遺伝子診断によって判断する方法が実用化されている(Oncotype DX; 再発と相関する 21 遺伝子の発現パターン診断キット。MammaPrint; 再発と相関する 70 遺伝子の発現パターン診断キット)⁵⁾。これらの方法は、再発可能性が高く化学療法のベネフィットが副作用によるリスクを上回る可能性が高い患者を選択してアジュバンド化学療法を実施することを目的としており、初期乳がん患者個々の化学療法適応を判断する新しい試みとして画期的であるが、抗がん剤治療に用いられる個々の薬剤の感受性因子、非感受性因子を明らかにして、それらに対する併用薬の組み合わせをオーダーメイドするという段階までには至っていない。

一方、抗がん剤感受性を支配する遺伝子を同定する方法として、DNA チップや質量分析装置を用いて、感受性と非感受性患者由来の組織で発現している遺伝子やタンパク質を網羅的に比較・解析することにより、両方で発現が異なる遺伝子を受容性決定因子として抽出選択する手法が挙げられる。例えば、大手製薬企業 Bristol-Myers Squibb のグループはマルチキナーゼ阻害剤である Dasatinib や細胞分裂阻害剤 Etoposide に関して、これらの薬剤に対する感受性の異なる乳がん細胞株パネルの遺伝子プロファイリングの違いから感受性予測因子の絞込みを行い、臨床における感受性、非感受性患者を見分けていく試みを、学会、論文等で報告している⁶⁾。しかしながら、このような網羅的な感受性因子探索手法により、感受性に関わることが示唆される数多くの候補遺伝子が見つかるものの、その中から候補遺伝子の機能と抗がん剤感受性の関わりを明らかにし、さらには候補遺伝子の中から創薬ターゲットとなる遺伝子を同定することは必ずしも容易ではない。上記の候補絞込みが発現量の統計的有意性に基づくものであり、個々の遺伝子の機能やその相関について必ずしも勘案していないことや、細胞株での感受性・非感受性と臨床腫瘍との相違(予測性を上げるために細胞株をどう選択するか?)や、ハイスループットで網羅的に得られるアレイデータを処理するバイオインフォマティクスの手法の限界などに起因していると考えられる。

siRNA 技術の登場により、ヒトゲノム遺伝子 siRNA ライブラリーを用いた synthetic lethal screen と呼ばれる網羅的な細胞機能ゲノミクスの手法による既存抗がん剤感受性因子を探索する試みについても報告されている⁷⁻⁹⁾。例えば、sub-lethal dose のパクリタキセルをがん細胞に作用させておいて、殺細胞活性に対する siRNA の影響を解析することによってパクリタキセルの感受性因子を見出す試みが複数のグループから報告され、ノックダウンによりパクリタキセルの殺細胞活性が増強される因子として、セラミド輸送に関わる分子(COL4A3B、CERT)やプロテアソームの複合体因子などが選択されている。しかしながら、これらそれぞれの報告で行き着いた標的分子は異なっており、用いる細胞株や最終的な選択基準などによって結果は異なる。理論的にはヒトゲノム siRNA ライブラリーの中にほぼすべての標的分子が含まれているはずであり、絨毯爆撃的なアプローチでスクリーニングすることにより標的分子がヒットしてくるはずであるが、大量の siRNA 実験データ解釈については、細胞株の選択や網羅的に得られる siRNA と抗細胞活性相関データのデータ処理について、上記の網羅的発現解析と同様の問題点を孕んでいる。

以上のような、抗がん剤創薬の世界的な動きを踏まえた上で、本プロジェクトは新たな創薬アプローチを形成する試みと考えている。

分子標的薬の登場により、がん選択的な標的探索から薬剤開発、さらには標的に相関したバイオマーカーを用いた患者選択や効果判定などが一貫して求められる時代を向かえ、テーラーメイド医療への試みが現実のものとなってきたが、単剤で治癒にいたる新規薬剤が登場しない現状では、既存抗がん剤の強化や併用を前提とした薬剤探索が重要となる。しかしながら、既存抗がん剤のカクテル療法に代表されるように併用薬の組み合わせやそれに適した患者の選択については、その根拠となるサイエンスやバイオマーカーの利用が未開拓の領域として残されている。

前述のように、現在世界的には欧米メガファーマ等を中心として、① マイクロアレイを用いた感受性、非感受性患者や細胞株の比較から感受性因子の候補を抽出するアプローチ、② ゲノム

ワイド siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングから既存抗がん剤の感受性を増強させる遺伝子候補を抽出するアプローチなどが試みられているが、本プロジェクトでは併用による既存薬強化という観点から、マイクロアレイやゲノムワイド siRNA ライブラリーを用いた絨毯爆撃的な標的探索や薬剤スクリーニングには欠けている観点に着手する。すなわち、従来行われているマイクロアレイによる感受性因子選択では、患者組織や細胞株のスナップショット（静的なプロファイル）としての遺伝子解析から感受性、非感受性因子を抽出するが、既存抗がん剤を作用させているときの遺伝子や細胞内シグナルの動き（動的なプロファイル）を加味したものではない。分子標的薬単剤に対しては、既に感受性、非感受性の患者や細胞株のスナップショット的な解析で得られる耐性（非感受性）因子の解析が進み、それに対応する次世代の薬剤開発が進んでいる例がある（グリベックの耐性変異に対する第2世代分子標的薬の開発など）。ただし、がん細胞はその多様性や高頻度な変異出現などにより、あらゆる手段の逃げ道を見出して耐性を獲得するため、これまでの既存化学療法でも経験してきたように、個々の耐性のメカニズム同定とそれに対する新たな分子標的薬の開発は、がん細胞と新しい分子標的創薬の“いたちごっこ”に陥る可能性を秘めている。これに対して、抗がん剤の薬効発現メカニズムを考慮した薬力学的な併用組み合わせのオーダーメイドを考えていくためのサイエンスは世界的にも未成熟な分野であり、既存薬を作用させたときに動的に機能する遺伝子発現、シグナル伝達のパスウェイや、またそれらと関連する重要なパスウェイを予め同定し抑えていくアプローチは、新たな戦略となりうる可能性がある。

本プロジェクトでは、既存薬併用時に動的に変化する遺伝子や細胞内シグナル伝達や関連する遺伝子発現の変動など“パスウェイ”を併用時の創薬標的として選択するアプローチを試みている。具体的にはパクリタキセル感受性をケースとして取り上げ、臨床での感受性、非感受性が明らかになっている患者腫瘍組織からのマイクロアレイ解析で得られたスナップショット（静的なプロファイル）の比較から得られた感受性因子候補遺伝子群から、従来のようにそのまま網羅的なデータ統計解析手法によって一挙に絞込みを行う前に、パスウェイ解析とセルアレイ実験を組み合わせる候補遺伝子 siRNA とパクリタキセルの併用実験データを取得するサイクルを繰り返すことにより、感受性に関連するパスウェイを絞りこむ方法を試みた。この方法により、網羅的なマイクロアレイとパスウェイ解析でフィルターをかけた候補遺伝子 siRNA の機能的な寄与（＝パクリタキセル抗細胞活性増強）を加味しながらパスウェイを絞り込むことができると同時に、セルアレイを用いて細胞の機能データを一挙に取得することによる効率的な候補遺伝子絞込み技術としての可能性を示すことを目標とする。

また一方、今後こういった動的パスウェイの解析に必須になると考えられる基盤技術開発にも着手する。具体的には、細胞内の遺伝子やシグナル伝達の流れを時系列で解析する技術への取り組みが挙げられる。これが可能になればパスウェイ間の相関強度を評価しながら、奏効のある干渉点・干渉方法を抽出することにより、併用時に狙うべきパスウェイ標的を絞込み、そこに作用する併用薬を選択したり、併用時に動く標的を狙う新たな創薬戦略に有用な技術となることが期待される。

上記のような併用戦略を目指したパスウェイ創薬においては、標的探索や化合物評価に際して、これまで欧米大手製薬会社や専門ベンチャー企業を中心に組み込まれてきた、大規模化合物ライブラリーや、ヒトゲノムを網羅した siRNA ライブラリーなどのハイスループットアッセイ系による絨毯爆撃的なアプローチが必ずしも適しているとは言えない。すなわち、スループットを重視したアプローチでは、着目した標的分子にフォーカスしての酵素アッセイ、結合アッセイや殺細胞活性などの指標が利用されるのに対して、細胞内パスウェイを重視した創薬アプローチでは、細胞増殖を含む複数の機能や表現型を同時に指標として阻害剤を探索するアプローチの重要性が増してくると考えられる。このような背景のもと、“細胞”というブラックボックスの中で起こる標的分子間の相互作用や、その結果としての細胞機能（増殖や浸潤・転移など）との繋がりを理

解する方法論の確立は、今後の創薬において重要な課題となってくる。本プロジェクトで取り組んでいる、細胞機能解析技術や一細胞時系列解析技術を総合的に組み合わせることができれば、日本発の新たな創薬基盤技術となっていくことが期待される。

参考文献

1. Critical Path Opportunities Report/List, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, March 2006
2. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR. *N Engl J Med.* 2008, 359(17):1757-65.
3. Pharmaceuticals: a new grammar for drug discovery. Fishman MC, Porter JA. *Nature.* 2005, 437(7058):491-3.
4. Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. Feng Y, Mitchison TJ, Bender A, Young DW, Tallarico JA. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 7 :567-78.
5. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. Dobbe E, Gurney K, Kiekow S, Lafferty JS, Kolesar JM. *Am J Health Syst Pharm.* 2008, 65(1):23-8.
6. Identification of Candidate Molecular Markers Predicting Sensitivity in Solid Tumors to Dasatinib: Rationale for Patient Selection. Fei Huang, Karen Reeves, Xia Han, Craig Fairchild, Suso Platero, Tai W. Wong, Francis Lee, Peter Shaw, and Edwin Clark. *Cancer Res* 2007 67: 2226-2238.
7. Rational design of cancer-drug combinations. Ramaswamy S. *N Engl J Med.* 2007, 357(3):299-300.
8. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, Minna JD, Michnoff C, Hao W, Roth MG, Xie XJ, White MA. *Nature.* 2007, 446(7137):815-9.
9. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, Elustondo F, Chang J, Temple J, Ahmed AA, Brenton JD, Downward J, Nicke B. *Cancer Cell.* 2007, 6:498-512.

4-2 パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索（癌研究会、協和発酵キリン）

近年、ゲノム解析研究が急速に発展し、マイクロアレイなどを用いた網羅的遺伝子発現解析によって、がんの発生や進展に関わる遺伝子や薬剤の治療感受性を規定する候補遺伝子が数多く見出されてきた。マイクロアレイを用いた網羅的解析は優れた予測モデル（数多くの候補遺伝子）を作りだすが、そこから真のターゲットを同定することは容易ではなく、なかなか臨床応用に結びつかないのが現状である。薬剤感受性など特定の病態の発現機序を解明するためには、それら候補遺伝子の機能（薬剤感受性に関わるパスウェイ）を理解し遺伝子を絞り込むことが重要である。そこで、本プロジェクトの基盤技術であるセルアレイを用いて、乳がんの薬剤感受性を規定する候補遺伝子を機能解析により絞り込み、真のターゲットを同定することで当該技術の最適化と有用性の評価を行った。

乳がんにおけるパクリタキセル術前化学療法をモデルとして、パクリタキセル感受性に関わる遺伝子の同定を進めた。パクリタキセル単剤による術前化学療法を行う患者より採取された腫瘍の遺伝子発現（約 21,000 遺伝子）プロファイルデータを解析し、治療後の病理効果判定をもとに有効群と無効群において発現に差のある遺伝子（106 遺伝子）を選定し、候補遺伝子とした。

セルアレイによる乳がん細胞の細胞死を指標にした、抗がん剤感受性に対する候補遺伝子の機能の Loss-of-function 解析システム（抗がん剤感受性候補遺伝子の発現チャレンジシステム）を確立し、パクリタキセル感受性を規定する遺伝子群を絞り込んだ。1st スクリーニングにより、パクリタキセルによる薬剤感受性に影響を与えた遺伝子として、パクリタキセル依存性細胞死阻害遺伝子 20 個とパクリタキセル依存性細胞死誘導遺伝子 28 個を絞り込んだ。選定された遺伝子群については、テキストマイニングによるパスウェイ解析から各遺伝子に相互作用する新たな候補遺伝子の選定を行い、発現チャレンジシステムを用いた大規模なパスウェイ解析による検証を進めた。薬剤感受性など特定の病態の発現機序を解明するためには、大規模なパスウェイ解析に展開し、それら候補遺伝子の機能を理解することが重要と考えられるが、このような大規模な機能解析に展開することは、上記セルアレイ技術を応用すれば十分に可能であることが示唆された。

一方、遺伝子の機能解析や新たな創薬に応用可能な研究材料として、臨床情報と分子生物学的特性が付加された臨床モデル培養細胞が重要と考えられるが、入手可能な培養細胞株として現存しない。そこで本技術に有用なモデル培養細胞株の樹立を行った。乳がんを対象として手術材料や生検材料（腫瘍組織）を用いた培養細胞株樹立について、倫理、細胞の取り扱い、細胞株の樹立方法、または、DNA 一次構造および遺伝子発現プロファイルで比較検討する為のシステムを構築し、乳がんモデル培養細胞株樹立を行い、臨床情報と分子生物学的特性が付加されたモデル培養細胞の樹立が可能になった。ここで樹立されるモデル細胞は、セルアレイを用い同定した薬剤感受性遺伝子機能ネットワークの検証にも有用である。

近年のマイクロアレイに代表されるゲノム科学の進歩にともない、がんをはじめ多くの疾患で分子レベルでの解明が進んでいる。網羅的遺伝子発現解析からは、がんを臨床学的転帰に応じて分子レベルで細分類できる可能性や、抗がん剤をはじめとする各種薬剤の治療応答性を予測できる可能性が示唆され、数多くの候補遺伝子が報告されてきている。一方で、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析から、目的に応じた候補遺伝子は数多く抽出されるが、そこから真のターゲットを同定することは容易ではなく、開発される診断技術（選定された遺伝子群を用いた予測モデル）の多くは、その精度に問題があり、なかなか臨床応用に結びつかないのも現状である。これは、選定されてきた遺伝子は、包括的遺伝子発現解析から得られた膨大な量の遺伝子発現データを基に統計学的手法により抽出された遺伝子群であり、個々の機能については勘案していないことが一つの理由である。そのため、このようなハイスループット手法によって目的遺伝子をおおまかに選択することは可能であるが、より精密な評価のためにはハイスループット化するこ

とによる細胞に対する影響を評価する系の開発が必要である。

本研究では、乳がんにおける最も有効な抗がん剤の一つであるパクリタキセルによる術前化学療法をモデルとして、マイクロアレイデータから得られた薬剤感受性を規定する候補遺伝子群を機能解析により絞り込み、真のターゲットの同定を行った。遺伝子絞り込み技術としてセルアレイを用いた機能的スクリーニングにより、パクリタキセル感受性に抵抗性を示す 8 個の遺伝子 (3パスウェイ) を同定し、パクリタキセル治療効果予測システムの構築およびパクリタキセル併用治療標的としての有用性の評価を行った。

今回同定した遺伝子群を用いて構築したパクリタキセル治療効果予測システムは、新規追加症例を用いた検証実験で、通常の統計学的手法で絞り込まれた遺伝子群を用いた診断システムと比較し高精度を示した。薬剤感受性診断に関して、機能解析によるスクリーニングをもとに選定した遺伝子群 (薬効発現機序に関わる遺伝子群) を用いた治療効果予測システムは初めてであり、より精度の高い治療効果予測システムの確立が可能と考えられ、患者に合わせた最も有効な抗がん剤の選択に有用と考えられた。

一方、ウェルベースの検証実験により、今回同定された遺伝子の単独 siRNA ノックダウン実験を行った。それぞれの候補遺伝子単独で乳がん細胞に対する抗細胞活性は見られないが、パクリタキセルとの併用時のパクリタキセル感受性の増強作用が確認された。さらに、複数のパスウェイの組み合わせ阻害による効果増強を検討した結果、2 つのパスウェイの組み合わせによりパクリタキセル感受性増強作用がさらに強くなる可能性を示すことができた。これらの結果より、薬効発現機序に関わるパスウェイを標的にした、抗がん剤増強薬の開発につながる可能性を示すことができたと考えられる。

また、遺伝子の機能解析や新たな創薬に応用可能な研究材料として、臨床情報と分子生物学的特性が付加された臨床モデル培養細胞が重要と考えられるが、入手可能な培養細胞株として現存しない。そこで乳がん患者から得られた腫瘍組織を用い、ER,PgR,Her2 陰性 (トリプルネガティブ) の充実性腺管がん 1 株、悪性葉状腫瘍 2 株を含む 9 株の乳がん培養細胞株の樹立に成功した。トリプルネガティブの充実性腺管がんにおいては scid マウス移植モデルの作製に成功した。トリプルネガティブ乳がんおよび悪性葉状腫瘍の培養細胞株は貴重であり、これらのモデル細胞は、セルアレイを用い同定した薬剤感受性ネットワークの検証だけでなく創薬にも応用可能であると考えられる。

具体的な技術開発項目としては新規に開発したセルアレイ技術等を用い、創薬の基盤技術になりうるパスウェイ解析・創薬ターゲット同定技術を開発する。(図 4(2)-1)

- ・本プロジェクトの基盤技術であるセルアレイを用いて機能ネットワーク解析システム (ターゲットバリデーションシステム) を開発し、抗がん剤感受性を規定する遺伝子を機能解析により絞り込み、真のターゲットを同定することで当該技術の最適化と有用性の評価を行う。
- ・同定された薬剤感受性を規定するパスウェイ (遺伝子) を用い、抗がん剤の治療効果予測システムの構築および治療標的としての有用性を検討する。
- ・臨床情報および分子生物学的特性が付加された、薬剤感受性ネットワークの検証だけでなく創薬に応用可能な乳がんモデル培養細胞株を樹立する。

次に上記開発項目の価値づけとして科学的、技術的側面から述べる。

【科学的視点】

(1) 従来の抗がん剤創薬と多剤併用療法の限界

ゲノム創薬以前の抗がん剤創薬は細胞毒性物質のスクリーニングであり、がん細胞に対する殺

細胞活性を指標として多くの抗がん剤が見出され開発された（図 4(2)-2）。本研究で扱っているパクリタキセルもこの種の抗がん剤に含まれる薬剤であり、細胞の微小管重合に作用して、細胞分裂を阻害することで、細胞増殖が盛んな細胞の細胞分裂を止めることによって殺細胞活性を示す化合物である。

これらの抗がん剤によって、白血病などいくつかの悪性腫瘍においては治癒や延命効果が認められるものの、その他大部分のがんにおいては一時的な腫瘍縮小効果が認められたとしても、十分な延命効果は期待できないのが現実である。また、そもそもがん細胞の増殖を選択的に阻害するメカニズムでは無いことから、腫瘍と正常組織への作用選択性が低いために、薬効を得るためには人体に対する最大耐容量（maximum tolerable dose= MTD）付近で投与されることが多く、正常組織も非選択的な増殖阻害や殺細胞活性の影響をうけるため、強い副作用を発現するケースも少なくない。一方で、これら細胞毒に対しても不応答のがん細胞が存在するために治療効果がみられなかったり、治療の過程でがん細胞が耐性化して効かなくなるといった効果の限界も明らかになっている。そこで、抗がん剤治療の臨床現場では、個々の抗がん剤単剤での効果の弱さや耐性出現の問題を克服するために、多剤併用療法が一般的に行われてきた。すなわち、副作用が重なったり増強しないような薬剤の組み合わせや投与スケジュールを工夫して、副作用の上乗せを最小限におさえ、最大薬効を得る抗がん剤カクテル併用が確立されてきた。しかし、これらの多くは主に臨床現場でのトライアンドエラーで確立されてきた治療法であり、有用な組み合わせが見出され、標準療法として定着しているものも多いが、臨床開発の過程で薬効と副作用とバランスで判断して併用メリットが見出せずに確立されなかった例も多く、試行錯誤で薬剤を組み合わせしていく従来の方法論で効率的に新たな治療法を見出していくことには限界がある（図 4(2)-3）。

(2) 分子標的抗がん剤創薬

がん分子標的薬は、がんの分子生物学の進展やゲノム解析の進展に伴い、がん細胞の増殖や生存に関わるがん遺伝子等の標的分子を選択的に阻害する薬剤を開発する試みである。このコンセプトで開発された薬剤の臨床応用が 1990 年代後半から 21 世紀にかけて現実のものとなり、標的として想定したタンパク分子への結合や酵素アッセイ、あるいは標的分子を発現した細胞に対する選択的な抗細胞活性などを High Throughput Screening (HTS) の指標とした大規模スクリーニングから見出された低分子化合物（主にキナーゼ阻害薬）が臨床現場でも効果を示すことが明らかとなってきた。また抗体医薬の分野でも、がん細胞の表面抗原やがん細胞分泌因子を標的とした薬剤が上市され臨床効果を示す時代となった（図 4(2)-4）。

しかし、このようなゲノム創薬、HTS の時代を迎え、以前と比べて上市される新薬が爆発的に増加したかと言えばそうではない。ヒトゲノム解析完成の時期を挟んだ 1996 年から 2009 年の間に米国 FDA で承認された新薬の数はむしろ減少・停滞していると報告されており¹⁾、分子標的、ゲノム創薬は創薬効率の向上には必ずしも直結していない。

その原因として様々な要因が挙げられているが、一つの理由として分子標的薬の薬効の限界が挙げられる。慢性骨髄性白血病 (CML) の原因遺伝子である Bcr-Abl 転座産物を標的とした imatinib は、実際の臨床現場で単剤で慢性期 CML 患者に対する奏効率 90% 以上という劇的な効果を示して CML の標準治療体系を変えるほどの影響を及ぼしたが、そのような分子標的薬はレアなケースであり、多くの分子標的薬の単剤での効果には限界がある。むしろ、数々の分子標的薬の臨床試験が進むにともなって、分子標的薬も決して単一の薬剤でがんを消滅させる夢の特効薬ではないことが明らかになってきた。新薬の臨床開発においては、第一相臨床試験 (Phase I) として単剤での毒性発現が評価されるが、抗がん剤開発の分野では実際のがん患者に対して投与が行われるため、第一相試験での薬効レスポンスもその後の開発方針の指標とされる場合が多い。1990 年代後半の分子標的薬臨床試験の時代に入り Phase I 臨床試験での毒性発現率は低下しているものの、この単剤臨床試験時点で薬効（がんの縮小効果を示す奏効率）が見えてくる確率も低くなっ

ているという報告がある²⁾。このような現状から、さらに第二相、第三相と薬剤の開発が進み、分子標的薬が承認され臨床現場で使われる際には、最終的に既存薬との併用で使われているケースが多い。分子標的療法の臨床応用が日本よりも進んでおりより多くの分子標的薬が使われている米国における標準治療ガイドライン（NCCN ガイドライン）を見ても、患者数が多くメジャーながん種である大腸がん、乳がん、非小細胞肺癌で現時点で使われる薬剤の主流は依然として従来の化学療法剤であり、ここ数年で認可された分子標的薬はすべて化学療法剤との併用での治療レジメが標準用法とされている（図 4(2)-5）。

(3) 本プロジェクトの位置づけ

上記のように分子標的薬の時代となっても、新しく登場した分子標的薬が臨床現場において既存抗がん剤と置き換わっていくわけではなく、むしろ既存抗がん剤と分子標的薬の併用療法での開発が主流となっている。すなわち、既存抗がん剤は臨床現場において依然として使われ続けており、既存薬の薬効増強はゲノム創薬、分子標的薬の時代においても重要な課題である。分子標的薬と既存抗がん剤の併用は、既存抗がん剤のカクテル療法開発と同様に、臨床試験で有用性が示されることによって初めて臨床現場での標準療法として使われるようになる。しかしながら、分子標的療法+既存薬併用の時代となっても、併用療法のサイエンスには大きな進展はなく、科学的な根拠に基づいた併用療法の効率的な開発が可能になっているとは言い難い（図 4(2)-6）。すなわち、分子標的薬が現実のものとなった現在においても、単剤で治癒にいたる新薬が登場しない現状では、既存抗がん剤の強化、併用を前提とした薬剤開発は残された重要な課題であり、既存薬併用のサイエンスの道を切り開くことが、抗がん剤創薬の新たなツールとなる可能性が考えられる。

このような背景から、本プロジェクトではケーススタディーとして既存抗がん剤パクリタキセルを取り上げ、その応答性に関与する新たなパスウェイの絞込み方法の確立と、診断用途、併用治療用途への応用可能性を検証した。パクリタキセル投与時に機能してその感受性に関与するパスウェイを標的とする薬剤開発アプローチは、がん細胞の細胞増殖や転移・浸潤等で機能する分子を見出して、それら分子を分子ターゲットとして新しい薬剤を開発してきた現状の分子標的創薬とは異なり、既存薬増強を目的とした新たな創薬アプローチとなる可能性があると考えている（図 4(2)-7）。

【技術的視点】

本プロジェクトで取り組んだ既存抗がん剤パクリタキセルの効果予測ならびに効果増強因子の探索のアプローチに関して、以下の観点で世界的な研究、開発の動向と比較した。

(1) 分子標的薬耐性解析

がんは既存化学療法剤に対して不応答や耐性を示し、単剤での効果には限界があることを前述した。しかし、近年臨床現場で使われるようになった分子標的薬に関しても不応答や耐性化する患者が存在することが明らかになっている。臨床応用が進んでいるキナーゼ阻害剤の研究では、低分子薬の結合部位点変異やバイパス経路・下流因子の活性化による耐性機序が明らかとなっており、不応答、耐性といった現象が分子レベルで理解され、感受性、耐性予測バイオマーカーや耐性化に関与する分子を狙った新たな分子標的薬が開発されている。これらの感受性や耐性に関する研究は、分子標的薬単剤の効果を予測し、患者を選択するアプローチとして考えられているが、既存薬との併用を意識したものではない。また、がんの多様性、適応能力の高さを考えると先行する分子標的薬に対する耐性メカニズムに関与する標的を狙って新規薬剤を次々と開発していくやり方では、次なる耐性発現との“いたちごっこ”になってしまう可能性が予測される。本プロジェクトでは、分子標的薬の耐性分子を同定しそれを標的とした分子標的薬を開発するアプ

ローチではなく、既存抗がん剤の薬効増強を目指した併用時の分子標的を見出す手法の開発を試みた（図 4(2)-8）。

(2) アレイ解析を用いた診断、薬剤感受性予測技術

既存抗がん剤感受性を支配する遺伝子同定の従来法の一つとしては、DNA チップや質量分析装置を用いて患者由来のがん組織と正常細胞で発現している遺伝子やタンパク質を網羅的に比較、解析することにより感受性に関わる因子を抽出選択する手法も進展している。乳がんの分野ではホルモン療法等の治療を受けた患者が、再発を防ぐための全身化学療法（アジュバンド治療）を受けるか否かを予後因子遺伝子診断によって判断する方法が実用化された（Oncotype DX；再発と相関する 21 遺伝子の発現パターン診断キット。MammaPrint；再発と相関する 70 遺伝子の発現パターン診断キット）³⁾。これらの方法は、再発可能性が高く化学療法のベネフィットが副作用によるリスクを上回る可能性が高い患者を選択してアジュバンド化学療法を実施することを目的としており、初期乳がん患者の化学療法実施を判断する新しい試みと言える。しかしながら、これらのアプローチは、治療法開発を意図したものではなく、化学療法に対する感受性因子、非感受性因子を明らかにして、それらに対する併用薬の組み合わせや新たな併用標的薬剤をオーダーメイドするという目的には繋がっていない。

セルラインを用いたアレイ解析データから薬剤感受性を予測する技術にも進展が見られる。大手製薬企業 Bristol-Myers Squibb のグループはマルチキナーゼ阻害剤である Dasatinib や細胞分裂阻害剤 Etoposide に関して、これらの薬剤に対する感受性の異なる乳がん細胞株パネルのアレイ解析データを取得し、遺伝子プロファイリングの違いから感受性予測因子の絞込みを行い、臨床における感受性、非感受性患者を見分けていく試みを、学会、論文等で報告している⁴⁾。これら報告は、セルラインのデータから臨床での薬剤感受性因子を選択してくるアプローチとして注目される。ただしこれら報告に関しても、対象としている薬剤（Dasatinib、Etoposide）単独の効果を予測し、その薬剤を使用する患者を選択する際に用いることを目的としており、既存薬併用による効果増強を目指した創薬を意図したものではない。

本プロジェクトでは、現在臨床現場で使われている重要な抗がん剤の一つであるパクリタキセルに対する感受性、非感受性患者のアレイ解析で得られるデータから、診断ならびに治療用途での展開可能性が考えられる因子の抽出を試みた。アレイデータの網羅的な統計解析手法により一挙に絞込みを行って結論を出すのではなく、パスウェイ解析とセルアレイ実験を組み合わせ、候補遺伝子 siRNA とパクリタキセルの併用抗細胞データを取得するサイクルを繰り返すことにより、感受性に関連するパスウェイを絞りこむ方法を提案して検証した。この技術により、大量のアレイデータから機能解析データを加味しながらパスウェイを絞り込むことができると同時に、アレイとパスウェイ解析でフィルターをかけた候補遺伝子 siRNA を一挙にセルアレイ上でデータ取得することによる効率的な候補遺伝子絞込み技術としての可能性を示した（図 4(2)-9）。

(3) siRNA ライブラリースクリーニングによる創薬標的的同定

siRNA 技術の登場により、ヒトゲノム遺伝子 siRNA ライブラリーを用いた網羅的機能ゲノミクスの手法による創薬研究の試みが報告されるようになった⁵⁾。本プロジェクトに関連する報告としては、ヒトゲノム遺伝子 siRNA ライブラリーを用いてパクリタキセル感受性因子を探索した、いくつかの論文が報告されている。Angelique W.Whitehurst（University Texas Southwestern Medical Center）らのグループは、肺がん HCT-H1555 株を用いて、低濃度のパクリタキセルによる抗細胞活性を増強する遺伝子をヒトゲノム siRNA ライブラリーから選択する“Synthetic lethal screening”を行い、プロテオソームサブユニット遺伝子を含む複数の遺伝子をパクリタキセル耐性遺伝子候補として選択している⁶⁾。また、Charles Swanton（Cancer Research UK）らのグループは、肺がん A549 株、乳がん MDA-MB-231 株、大腸がん HCT-116 株を用いて、パクリタキセル、シスプラチ

ン、ドキシソルビシン、5-FU 等の抗がん剤の殺細胞活性に影響する遺伝子をヒト遺伝子 siRNA ライブラリーからスクリーニングした結果、既存薬の抗細胞活性を増強する標的として、スフィンゴ脂質代謝（セラミド輸送）に関わる COL4A3BP を見出している⁷⁾。これら二つの報告は何れもヒト遺伝子を網羅する siRNA ライブラリーの絨毯爆撃的なスクリーニングアプローチでパクリタキセル感受性に関わる遺伝子を選択しているが、スクリーニングヒットの絞込みの過程でそれぞれ ① siRNA スクリーニングデータの再現性、② 関連分子が複数ヒットしている、③ 複数の細胞株で同一の標的がヒットする、④ 複数の薬剤で感受性に関与している、など個々の報告により様々な基準を設定しており結果的には二つの報告で異なる因子が選択されている。siRNA 技術の発展により、ヒトゲノム siRNA ライブラリーからの網羅的な標的探索が可能になってきたが、その膨大なノックダウン実験データから、科学的根拠に基づいて標的候補を絞り込む方法論については、未だ確立された方法論は無く、発展途上の課題を含んでいると考えられる。

本研究では、ヒトゲノムを網羅した siRNA ライブラリーを絨毯爆撃的にスクリーニングして、その結果から上記のような選択基準や統計的な手法で一挙に標的を絞り込む方法とは異なり、まずパクリタキセル感受性、非感受性の患者組織のアレイ比較解析により、パクリタキセル感受性に関与すると考えられる遺伝子候補を予め選択して、選択された siRNA に限定してセルアレイによる機能解析（パクリタキセル抗細胞活性増強作用の確認）を行った。また、その結果ヒットした遺伝子のパスウェイ解析からネットワーク上で関連する遺伝子を再度広げて検索し、再選択した関連遺伝子 siRNA のセルアレイによる機能解析を繰り返すことによって、パクリタキセル感受性に真に関連している因子とそのパスウェイを絞り込む方法を試みた。結果的に大規模なアレイ解析や網羅的な siRNA スクリーニングによらず、既存抗がん剤感受性に関わる因子の絞込みが可能であることを示すことができた。

(4) 細胞機能解析技術の組み合わせ

製薬企業による創薬アプローチは単離したタンパクや酵素を用いた結合アッセイや酵素アッセイによる大規模ハイスループットスクリーニングの時代から、細胞そのものを用いてその機能や表現型を指標とする“Multi-parameter phenotypic 創薬”の時代へとシフトしている⁸⁾。セルアレイによる細胞機能解析を取り入れて創薬標的絞込みを検証した本研究の手法は、これらの世界的な流れにフィットしたアプローチと言える。今回はパクリタキセルによる殺細胞活性増強をアウトプットとして創薬標的の同定を試みたが、本プロジェクト全体の中で行われた様々な細胞機能評価技術（例えば転移・浸潤の機能評価系など）を組み合わせたマルチなアウトプットが設定できれば、殺細胞活性以外の細胞機能を指標とした標的パスウェイ絞りこみ技術へと発展することが期待される。前述した感受性、非感受性細胞株のアレイ解析から感受性因子を探索する手法は、薬剤投与前の細胞のスナップショット的なプロファイル解析から薬剤の効果を予測しているに過ぎず、薬剤併用時の細胞内シグナルの動き（動的プロファイル）が加味されたものではない。今回の研究では実現できなかったが、時系列解析技術との組み合わせが可能になれば、薬剤併用時に応答する分子間の動的なパスウェイから標的分子を創出することにより従来の方法では見出せていない、新たな創薬標的の同定基盤技術としての応用が期待できる。そのためには、単純なネットワーク議論ではなく、細胞内の動的な分子状態を統合的に表現する方法論や、その結果としての細胞機能や表現系（増殖、浸潤、転移などを含む）との繋がりを理解する技術の充実が今後も重要な課題である（図 4(2)-10）。

参考文献

1. 2009 FDA drug approvals. Hughes B. Nat Rev Drug Discov. 2010, 9(2):89-92.
2. Why is cancer drug discovery so difficult? Kamb A, Wee S, Lengauer C. Nat Rev Drug Discov. 2007, 6(2):115-20.

3. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. Dobbe E, Gurney K, Kiekow S, Lafferty JS, Kolesar JM. *Am J Health Syst Pharm.* 2008, 65(1):23-8.
4. Identification of Candidate Molecular Markers Predicting Sensitivity in Solid Tumors to Dasatinib: Rationale for Patient Selection. Fei Huang, Karen Reeves, Xia Han, Craig Fairchild, Suso Platero, Tai W. Wong, Francis Lee, Peter Shaw, and Edwin Clark. *Cancer Res* 2007, 67: 2226-2238.
5. Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery. Iorns E, Lord CJ, Turner N, Ashworth A. *Nat Rev Drug Discov.* 2007, 7: 556-68.
6. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, Minna JD, Michnoff C, Hao W, Roth MG, Xie XJ, White MA. *Nature.* 2007, 446(7137):815-9.
7. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. Swanton C, Marani M, Pardo O, Warne PH, Kelly G, Sahai E, Elustondo F, Chang J, Temple J, Ahmed AA, Brenton JD, Downward J, Nicke B. *Cancer Cell.* 2007, 6 :498-512.
8. Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. Feng Y, Mitchison TJ, Bender A, Young DW, Tallarico JA. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 7 :567-78.

4-2-1 パクリタキセル感受性候補遺伝子の同定

本プロジェクトで開発したセルアレイを用いた抗がん剤感受性遺伝子の機能ネットワーク解析システムを用いて (図 4(2)-9)、パクリタキセル感受性に関わる遺伝子の同定を進めた。手術可能な原発性乳がんに対し、パクリタキセル単剤による術前化学療法を行う患者より、治療前に針生検により検体を採取後、マイクロダイセクションを用いてがん細胞を回収し、約 23,000 遺伝子の発現プロファイルデータを解析した。

病理学的に浸潤がんであることが確認された浸潤径 3 cm 以上の Stage IIa~IIIb の手術可能な原発性乳がんに対し、臨床試験の対象となるパクリタキセル単剤による術前化学療法を行う患者より (図 4(2)-11)、化学療法前に針生検により検体を採取した。あらかじめ遺伝子発現解析などについて同意が取れた患者だけが本試験にエントリーされている。採取した検体は、直ちに液体窒素中で凍結し、匿名化が行われ、Optimal cutting temperature (OCT) compound にて包埋後、クリオスタットで約 8~10 μ m の切片にし、薄切スライドを作製した (図 4(2)-12)。薄切スライドの一部は、Hematoxylin-Eosin 染色 (HE 染色) を行い、病理医により、がんの浸潤状態をはじめがん細胞の確認が行われる。採取したがん細胞は、各症例によりがんの含有率が大きく違い、そのまま RNA 抽出を行った場合、症例間でがん由来の RNA の抽出量が変わってくる (採取した組織の中の間質細胞や脂肪細胞の含有率によりがん細胞の割合が違う。または、がん細胞が採取組織中に点在している症例も多い) (図 4(2)-13)。正確にがん細胞特異的に発現している遺伝子を知りたいため、Hematoxylin 単色で染色した切片から laser beam microdissection を用いて間質細胞などを除き、がん細胞だけを選択的に回収した (図 4(2)-13)。RNA の抽出は、laser beam microdissection により回収したがん細胞から、RNeasy micro Kit (QIAGEN)により抽出した。また、抽出した RNA サンプルの質の評価には、Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technology 社)により、電気泳動像から totalRNA の分解度を check する際のツールである RIN (RNA integrity number) を用いて行い、RIN が 0.8 以上の質の高い RNA に関して解析に供した (図 4(2)-14)。遺伝子発現解析には、約 23,000 遺伝子について網羅的遺伝子発現解析法 (マイクロアレイ解析) を用い、各症例から採取したがん細胞の発現プロファイルを取得した。一方、検体を採取した患者は、直ちにパクリタキセル単剤による治療 (80 mg/m² の週 1 回、12 回投与 (3 ヶ月)) が行われ、治療終了後に手術が施行された。パクリタキセルによる治療の効果判定は、手術で摘出された標本をもとにした病理学的効果判定により評価した (図 4(2)-15)。今回 40 例がエントリーされ、その治療効果判定結

果を図 4(2)-16 に示す。パクリタキセルの治療感受性（治療が無効か有効か）については、これまでの臨床的検討から、治療後の病理学的効果判定の結果で明らかに予後が違う Grade 0、1 a、1 b を無効群、Grade 2 および 3 を有効群とし、両者を判別出来る遺伝子群の選定を行った。病理効果判定をもとに有効群（12 例）と無効群（28 例）とに分類し（図 4(2)-16）、各症例の腫瘍における遺伝子発現解析結果から 2 群間において発現に差が大きい遺伝子群（106 遺伝子）を Mann-Whitney U test により選定し、パクリタキセル感受性を規定する候補遺伝子とした。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析情報をもとに、統計学的手法により一挙に目的の遺伝子を絞り込み同定するという従来法は、薬剤感受性規定遺伝子をはじめとしてこれまで数多く報告されている。本プロジェクトでは、これら候補遺伝子から、プロジェクト前期で構築した機能解析による抗がん剤感受性遺伝子のスクリーニングシステム（発現チャレンジシステム）を用いて（図 4(2)-17）、それら候補遺伝子の機能を理解し、真の遺伝子の選別および機能ネットワークの抽出を行い、パクリタキセル治療感受性を規定する遺伝子（パスウェイ）の同定を進めた。

従来法により選定された 106 候補遺伝子について、siRNA 設計（2 siRNA/遺伝子）および合成、セルアレイ作製を行い、上記スクリーニングシステム（図 4(2)-17）を用いて、ターゲット遺伝子を siRNA でノックダウンすることにより、パクリタキセルの感受性に影響を与える遺伝子の絞り込みを行った。

ターゲットとした候補遺伝子に対するネガティブコントロールには、non-target siRNA を使用した。セルアレイ上における乳がん細胞への siRNA の取り込み効率は、蛍光標識した non-target siRNA による各種乳がん培養細胞で検討し、いずれの細胞株においても 90%以上と高い取り込み効率を示した（図 4(2)-18）。パクリタキセル感受性に影響する遺伝子の絞り込み（スクリーニング）には、4 種類の乳がん培養細胞株、HCC1806, HCC1954, MCF-7, MDA-MB468 を使用した。セルアレイ上に乳がん培養細胞株を播種し、siRNA トランスフェクションによる各ターゲット遺伝子のノックダウンを行い、24 時間のインキュベーション後に各種濃度のパクリタキセルを添加した。添加するパクリタキセルの濃度は、各細胞株で予め行った感受性試験により、EC50 を中心に決定した（図 4(2)-19）。パクリタキセル添加後 48 時間インキュベーションを行い、CellTrace, calcein red-orange を用いて染色を行い、細胞生存率の測定を行った。染色後のセルアレイをバイオチップリーダーで各スポットの蛍光強度を測定・数値化し（図 4(2)-20）、細胞死の割合を解析することでパクリタキセルの感受性に影響を与える遺伝子を選定した（図 4(2)-20、4(2)-21）。siRNA で遺伝子発現をノックダウンすることにより、コントロール siRNA に対して、パクリタキセルによる細胞死を 20%以上誘導（パクリタキセル依存性細胞死阻害遺伝子）またはパクリタキセルによる細胞死を 50%以上阻害する遺伝子（パクリタキセル依存性細胞死誘導遺伝子）をそれぞれ、20 個および 28 個選定した。

次に、セルアレイによる抗がん剤感受性遺伝子の機能解析システムを用いたスクリーニングで絞り込まれた上記 48 遺伝子について、テキストマイニングによる機能ネットワーク解析を行った。ネットワーク解析には、タンパク質間相互作用、タンパク質-低分子（薬剤/生体内低分子）相互作用、GPCR、転写因子、代謝経路情報、毒性パスウェイを収録したパスウェイ解析ツールである MetaCore（米国 GeneGo 社）を用い、絞り込まれた各遺伝子のパスウェイを抽出し、それぞれに相互作用する新たな遺伝子を合計 321 個選定し関連候補遺伝子とした（図 4(2)-22）。機能解析による抗がん剤感受性遺伝子のスクリーニングシステムで絞り込まれた 48 遺伝子に、それら遺伝子の機能ネットワーク解析により新たに選定された関連候補遺伝子を加え、セルアレイを用いた大規模な機能解析に展開した。

1stスクリーニングと同様に、セルアレイの作製には、各ターゲットに対し 2 種類の siRNA を合成しスポットした。セルアレイ上に乳がん培養細胞株（HCC1954, HCC1806 または MDA-MB468）を播種し、各 siRNA のトランスフェクションにより各ターゲット遺伝子のノックダウンを行い、24 時間のインキュベーション後に各種濃度のパクリタキセルを添加した。パクリタキセル添加 48

時間後、CellTrace, calcein red-orange による染色を行い、その蛍光強度の測定・数値化により細胞死の割合を判定することでパクリタキセルの感受性に影響を与える遺伝子を選定し、乳がん細胞のパクリタキセルによる細胞死を阻害する8遺伝子（3つのパスウェイ）が同定された（図4(2)-23）。このうちハブとなる3つの遺伝子（Lxxx1, Exxx1 および Rxxx1）は、マイクロアレイによる遺伝子発現解析により選定されてきた106遺伝子から絞り込まれてきたもので、臨床試験においてパクリタキセル有効群の患者から得られた腫瘍細胞に比べ、無効群の患者から得られた腫瘍細胞で発現が上昇している遺伝子であった。また他の5遺伝子については、セルアレイによる機能ネットワーク解析により、新たに選定・抽出された遺伝子ある。これらすべての遺伝子は、その発現を siRNA で抑制することによりパクリタキセルの細胞死を促進させる効果が認められ、パクリタキセルの感受性を阻害する遺伝子群（パスウェイ）である可能性が示唆された。同定されたこれら遺伝子について、パクリタキセル感受性診断用途およびパクリタキセル併用治療標的としての有用性の評価を行った。

4-2-2 パクリタキセル感受性診断の構築

4-2-2-1 パクリタキセル治療効果予測システムの構築

遺伝子絞り込み技術としてセルアレイによる機能的スクリーニングで同定された上記8個のパクリタキセル感受性規定遺伝子を基に、パクリタキセル治療効果予測システムの構築を行った。遺伝子発現データを基にした106候補遺伝子の選定のために行った乳がん術前化学療法（パクリタキセル）の臨床試験でエントリーされた40例をトレーニングケースとし、パクリタキセル治療効果予測システムの構築を行った。

まず、遺伝子発現解析データから選定した106遺伝子をもとに、パクリタキセルにより治療された40例を病理学的効果判定で分類した有効群（12例）と無効群（28例）の判別に最適な遺伝子セットを選定するという、従来法による統計学的手法で治療効果予測システムを構築した。システムの構築には、複数の推定手法による仮説を統合し、全体としての推定精度を向上させるアルゴリズムである Adaboost 解析を用いた。バイオインフォマティクスでは疾患の分類などにおいて精度向上に貢献しており、その効果が確認されている機械学習手法の1つである。106遺伝子から、Adaboost 解析によりクロスバリデーションによる誤判別率が小さく、また判別スコアの最も良い遺伝子の選定を行い、5個の遺伝子が選定された。この治療効果予測に必要な5遺伝子の発現解析データから Adaboost 解析により計算された Prediction-Score を縦軸に、それぞれの症例をその病理学的効果判定（横軸）に従ってプロットし、Prediction-Score の0以上が治療有効、0以下が無効と判別した（図4(2)-24）。Leave-one-out cross validation の結果、誤判別率は40例中4例（10%）であり、90%と高い正診率で治療有効群と無効群の判別が可能であった。

次に、従来法に加え遺伝子絞り込み技術としてセルアレイによる機能的スクリーニングで同定された8遺伝子を用い、上記と同様に40例をトレーニングケースとし、パクリタキセル治療効果予測システムの構築を Adaboost 解析により行った。有効群（12例）と無効群（28例）の判別に最適な遺伝子セットとして、クロスバリデーションによる誤判別率が小さく、また判別スコアの最も良い4遺伝子が選定された。この4遺伝子を用いた治療効果予測システムは、Leave-one-out cross validation の結果、誤判別率が40例中4例（10%）であり、従来法と比較して同等の高精度（90%の正診率）な診断システムの構築が可能であった（図4(2)-25）。診断システムの構築にあたり、遺伝子発現解析情報から従来法で絞り込まれた5遺伝子とセルアレイを用いた機能解析で選定された4遺伝子との間には重複はなかった。また、機能解析で選定された4遺伝子のうちの3遺伝子は、セルアレイを用いた機能解析（機能ネットワーク解析）により新たに選定されたパスウェイ上の遺伝子であり、マイクロアレイによる発現解析では抽出できなかった遺伝子であった。

4-2-2-2 パクリタキセル治療効果予測システムの検証

新規追加症例を用い、構築した2つの治療効果予測システムの検証を行い比較検討した。パクリタキセル感受性候補遺伝子選定で行った40症例と同様に、新たに乳がん術前化学療法の臨床試験を行い(図4(2)-15)、新規症例を追加しテストケースとし、構築した診断システムの検証に用いた。病理学的に浸潤がんであることが確認された浸潤径3cm以上のStage IIa~IIIbの手術可能な原発性乳がん対し、パクリタキセル単剤による術前化学療法を行う患者より、化学療法前に針生検により検体を採取した。laser beam microdissectionを用いてがん細胞を回収し、RNAを抽出後、遺伝子発現解析を行い上記で構築した2つの診断システムによる治療効果予測を行った。治療効果判定は、パクリタキセル単剤、80mg/m²の週1回、12回投与(3ヶ月)の治療終了後、手術で摘出された標本をもとに病理学的効果判定により評価し、遺伝子発現解析により判定した治療効果判定と比較検討した。今回、新規追加症例として28例がエントリーされ、パクリタキセル治療後に行われた手術摘出標本による病理学的効果は、無効21例および有効7例であった。

遺伝子発現解析情報から従来法で絞り込まれた5遺伝子を用いた診断システム(図4(2)-24)で、新規追加症例の治療後の病理効果判定を基に検証を行った結果、誤判別例が28例中12例認められ、正診率は57%と検証試験での精度は低かった(図4(2)-26、左)。一方、セルアレイを用いた機能ネットワーク解析で選定された4遺伝子を用いた診断システムの新規症例による検証では、誤判別例は28例中5例であり、正診率82%と高精度でパクリタキセルの治療効果をあらかじめ予測できることが示唆された(図4(2)-26、右)。

マイクロアレイを用いたがん組織の遺伝子発現を網羅的に概観することによって、がんの病態生理を分子レベルでより深く理解できるようになり、特徴的な遺伝子発現プロファイルに基づく分類を用いて、薬物療法に対する治療応答性をより正確に予測するシステムの構築が期待され、これまでも乳がんを含めた様々ながん腫において、遺伝子発現プロファイルをもとに、抗がん剤の治療感受性を規定する候補遺伝子が数多く報告されてきた。しかし、マイクロアレイを用いた網羅的解析は、トレーニングケースでは優れた予測モデル(数多くの候補遺伝子の選定が可能)を作りだすが、新規症例による検証実験(テストケース)では、精度が低く、臨床応用に結びつくものは中々ないのが現状であった。従来遺伝子選定は、包括的遺伝子発現解析から得られた膨大な量の遺伝子発現データを基に統計学的手法により抽出しており、個々の機能については勘案していないことが一つの理由である。統計学的な遺伝子の絞り込みの限界もありデータマイニングによる遺伝子の絞り込みで真のターゲットを同定することは容易ではない。薬剤感受性など特定の病態の発現機序を解明するためには、それら候補遺伝子の機能(薬剤感受性に関わるパスウェイ)を理解し遺伝子を絞り込むことが重要である。本プロジェクトで行ったように、マイクロアレイ解析からの網羅的な統計解析手法だけでなく、セルアレイを用いた機能的スクリーニングの組み合わせにより、個々の遺伝子の機能および機能ネットワークを解析し、機能的に重要な遺伝子群を抽出し、薬効発現機序に関わる遺伝子群を用いることで、より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立が可能と考えられる。本プロジェクトの解析では、マイクロアレイでは抽出できなかった薬剤感受性規定遺伝子の抽出により、高精度な治療効果予測が可能となった。薬剤感受性診断に関して、上記のような機能解析によるスクリーニングをもとに選定した遺伝子群(薬効発現機序に関わる遺伝子群)を用いた治療効果予測システムは初めてである。

現在の乳がん治療において、抗がん剤による治療は重要かつ不可欠な存在となってきた。従来からのanthracyclineを含む多剤併用やtaxane系薬剤に加え、経口fluorouracil系薬剤であるCapecitabineやTS-1、vinca alkaloids系抗悪性腫瘍剤であるvinorelbineも新たに加わり、多種多様な新規抗がん剤が登場している。これら薬剤の単独投与ならびに投与方法の組み合わせからなる化学療法は、今や乳がんでは欠くことができないが、実際の薬剤選択にあたっては、従来からの臨床病理学に基づいたリスクで分類し、国内外の大規模臨床試験の結果からなるいくつかの国際的な治療ガイドラインに沿って行われ、必ずしも、個々の乳がんの生物学的特性を反映したもので

はなくその奏効率も低い（図 4(2)-27）。乳がんの治療においては化学療法が汎用されるが、残念ながら現在のところ、その治療効果を予測するための、臨床応用されている正確な指標はない。本プロジェクトで構築されたような治療効果予測システムは、がんの個性に基づいた最も有効な抗がん剤の選択を可能にし、個別化医療の実現に貢献できるものと思われる。また、このような診断システムは、同種の機序を有する新薬の臨床開発においては、効果が期待される患者の選択を通して、より効率的な臨床試験を想定することが可能と考えられる。

4-2-3 パクリタキセル感受性遺伝子の同定とパクリタキセル併用治療標的としての評価

本プロジェクトで同定したパクリタキセルの薬効発現機序に関わるパスウェイを標的にした、抗がん剤（パクリタキセル）増強薬の開発の可能性について検討した。まず、遺伝子絞り込み技術としてセルアレイを用いた機能解析により同定された上記パクリタキセル感受性を規定する3つのパスウェイ（8遺伝子）について、96穴プレートを用いたウェルベースでの検証実験を行った。

スクリーニングに用いた乳がん細胞で、同定した8遺伝子の発現をそれぞれ siRNA でノックダウンし、48時間のインキュベーション後に各種濃度のパクリタキセルを添加した。遺伝子導入は、 5×10^3 個の乳がん培養細胞に、各ターゲットに対し 40nM の siRNA またはコントロールとして 50nM の non-target siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) による reverse transfection 法で行った（図 4(2)-28）。添加するパクリタキセルの濃度は、各細胞株で予め行った感受性試験により、EC50 を中心に決定した（図 4(2)-19）。パクリタキセル添加後 48 時間インキュベーションを行い、パクリタキセルに対する感受性を細胞生存率で検討した。細胞生存率は、WST-8 試薬（Cell counting kit-8, 細胞増殖/細胞毒性測定用試薬）を添加、インキュベーション後、マイクロプレートリーダーにて主波長 450 nm、副波長 650 nm で吸光度を測定し、コントロールに対する細胞生存率を求めた（図 4(2)-28）。コントロールと比較して、ターゲットとした8遺伝子に対する siRNA の乳がん培養細胞 HCC1954 における抗細胞効果（パクリタキセル無添加）は、ノックダウン（トランスフェクション）96時間後でもほとんど認められなかった（図 4(2)-29）。一方、各種濃度のパクリタキセルに対する感受性は、コントロールに対し 20%~40%の細胞死促進作用が認められた（図 4(2)-29）。Lxxx1, Exxx1 および Rxxx1 は、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルから選定・絞り込まれた遺伝子であり、臨床例においてパクリタキセル無効群の患者から得られた腫瘍細胞での発現が上昇している遺伝子である。Kxxx1, Jxxx2, Jxxx1, Axxx1 および Rxxx2 は、セルアレイを用いた機能ネットワーク解析により新たに選定され、上記3遺伝子のパスウェイ上の遺伝子である。これら遺伝子の siRNA による発現阻害により、パクリタキセルに対する感受性の増強効果が認められ、乳がん細胞においてパクリタキセルの感受性を阻害する遺伝子群であることが示唆された。さらに、HCC1806 乳がん培養細胞においても同様に、パクリタキセルに対する感受性の増強効果が検証された（図 4(2)-30）。

上記のように、同定された各遺伝子を siRNA 単剤でノックダウンすることにより、パクリタキセルによる細胞死の促進作用が認められたが、次に、3つのパスウェイとして注目したときに、複数パスウェイの組み合わせ阻害（同時阻害）によるパクリタキセル感受性増強効果の検証を行った。ターゲットとして、3つのパスウェイのうち Lxxx1 と Exxx1 をハブとする2つのパスウェイを siRNA により同時阻害したときのパクリタキセル感受性に与える影響を96穴プレートで検討した。乳がん培養細胞株（HCC1954）に、上記 siRNA 単剤による検証実験でパクリタキセルによる感受性増強効果が認められた濃度の半分の siRNA（20nM）を用いて遺伝子発現の阻害実験を行った。Lxxx1 と Exxx1 の siRNA をそれぞれ単独でトランスフェクションした時、および Lxxx1 と Exxx1 の siRNA を co-transfection（同時阻害）した時の乳がん細胞における抗細胞活性（パクリタキセル無添加）は認められなかった（図 4(2)-31）。また、siRNA 単独（20nM）で遺伝子をノックダウンした時の各種濃度のパクリタキセルに対する感受性への影響も認められなかった

(40nM で阻害した時のようなパクリタキセル添加による有意な細胞死の促進が認められない)。一方で、Lxxx1 と Exxx1 の siRNA を co-transfection し、2つのパスウェイを同時阻害したとき、パクリタキセルに対する感受性の増強効果が認められた。それぞれ単独ではパクリタキセル感受性への効果が認められなかった濃度の siRNA による発現阻害が、2つのパスウェイを同時阻害することにより、コントロールに対し 10~35%の細胞死促進作用が認められた (図 4(2)-31)。これらの結果より、パクリタキセル感受性に関わる複数のパスウェイの組み合わせ阻害により、パクリタキセルによる細胞死を相乗的に促進することが示唆された。

本プロジェクトでは、現在臨床で広く使われている重要な抗がん剤の一つであるパクリタキセルに対する感受性、非感受性患者腫瘍細胞のマイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現データから、治療用途での展開の可能性が考えられる因子の抽出を試みた。マイクロアレイデータの網羅的な統計解析手法により一挙に絞り込みを行って結論を出すのではなく、パスウェイ解析とセルアレイを用いた機能解析を組み合わせ、候補遺伝子 siRNA とパクリタキセルの併用抗細胞データを取得するサイクルを繰り返すことにより、感受性に関連する遺伝子やパスウェイを絞り込み検証を行った。それぞれの候補遺伝子単独で乳がん細胞に対する抗細胞活性は認められないが、パクリタキセルとの併用時のパクリタキセル感受性の増強作用が確認された。さらに、複数のパスウェイの組み合わせ阻害による効果増強を検討した結果、2つのパスウェイの組み合わせによりパクリタキセル感受性増強作用がさらに強くなる可能性が示され、薬効発現機序に関わるパスウェイを標的にした、抗がん剤増強薬の開発につながるものと思われる。

4-2-4 乳がん培養細胞株の樹立とターゲット遺伝子の検証

4-2-4-1 乳がん培養細胞株の樹立

乳がんを対象として手術材料や生検材料 (腫瘍組織) を用いて、本プロジェクトで構築したシステムをもとに培養細胞株の樹立を進めた (図 4(2)-32)。乳腺は表皮が皮下組織の中に落ち込んで出来た皮膚腺であり、小葉構造の間に豊富な結合組織が入り込み分岐した管である。ここに発生したがん組織およびがん細胞を出発材料とし培養株樹立を試みる時、豊富な結合組織の増生が大きな問題になる。この問題点を解決するための手段として、オリジナル無血清培地 (6052 培地) を作製し培養を試みた。

針生検または手術で摘出された腫瘍組織は、採取後直ちに培養へ移行した。採取した腫瘍部にある脂肪を取り除き生理食塩水で洗浄後、遺伝子解析用として腫瘍組織の一部を切り取り 2~3mm 角に細切し液体窒素で瞬時に凍結した。残りの腫瘍組織に培養液を加え、腫瘍部に割を入れる要領で組織が離れない程度に縦横切り裂き、培地中にこぼれ落ちた腺構造様の浮遊物を回収・遠心洗浄後ディッシュに播種し培養を開始した。さらに、残った組織片に培地を加え細切し、細切断片組織を除いた浮遊組織を回収・遠心洗浄後ディッシュに播種し培養を開始する。また、残りの細切断片組織は、酵素処理(collagenase + dispase)を行い100 μ mのセルストレイナー(BD falcon)で濾過後、ディッシュに播種し培養を開始した。3~4日ごとに培地交換を行いながら上皮細胞の確認をし、また確認できる間質細胞を取り除き、経過観察を行い必要に応じてサブクローニングを行う。

上記の方法により、手術材料に比べて採取出来る細胞量が少ない針生検サンプルからは、初代培養細胞の培養を進めた。生検で得られたサンプルについては、随時培養を行えるようにし、常時 10~20 株の培養細胞が維持できる環境を整備した (図 4(2)-32、4(2)-33)。また、手術で摘出された組織からは、培養細胞株の樹立を試み、9 株の乳がん培養細胞株を樹立した。その中の 1 例は、乳がんの発生や増殖に関係する主要な 3 つの因子、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、erbB2 (HER2) の発現が陰性である、トリプルネガティブと呼ばれる予後不良の充実性腺管がんである (図 4(2)-34)。ER、PgR、HER2 の免疫染色の結果、樹立培養細胞株においてもトリプルネガティブの性質を維持していることが確認された。BT-474 は、コントロールと

して用いた ER、PgR、HER2 がすべて陽性の乳がん培養細胞株 (図 4(2)-35)。さらに、この培養細胞株については、scid マウスに移植し Xenograft の作製を試みた。1 x 10⁷ 個の培養細胞を scid マウスの皮下に移植した。腫瘍増殖後、摘出した腫瘍組織の染色像を図 4(2)-36 に示す。明らかな腺空形成は見られないが、角化も見られず充実性に増殖する腺がんの scid マウス移植モデルの作製に成功している。

さらに、悪性葉状腫瘍から 2 株の培養細胞株樹立にも成功している。乳がん (<http://health.goo.ne.jp/medical/search/10311400.html>) は乳腺の腺管上皮から発生するが、葉状腫瘍は腺組織を囲む間質細胞が腫瘍化したものであり、急速に増大することが特徴の乳腺腫瘍であり、放射線、ホルモン療法は無効であり、抗がん剤治療にも限られた効果しか認められない。本プロジェクトでは、手術で摘出された 2 例の葉状腫瘍 (いずれも右肺転移巣) の組織から培養細胞株の樹立に成功した。Phyllodes #1 樹立細胞は、細長い突起を有する紡錘形の細胞形態を示し、増殖は緩慢である。少ないが大型の多核細胞が混在している。また、形態的には間質細胞とほとんど区別がつかない (図 4(2)-37)。この症例の生検材料によるホルモンレセプターの発現の検討では、ER、PgR とも陰性であり、さらに HER2 も陰性であった。同様に樹立細胞株の免疫染色によるそれら発現の検討でも、ER、PgR、HER2 ともに陰性であり、臨床症例組織の性質を維持していた (図 4(2)-38)。さらに、樹立細胞について、上皮細胞マーカーの抗体を用いた免疫染色の検討も行った。AE1/AE3 抗体は、ヒトサイトケラチン (CK) のミックス抗体 (multi-type) であり、AE1 が Type I の CK10/12/14/15/16/19 を、AE3 が Type II の CK1/3/4/5/6/7/8 を認識するためほぼすべての上皮細胞・がん腫細胞に反応する上皮細胞のマーカーである。図 4(2)-39 に示すように、AE1/AE3 によるサイトケラチンの発現は認められなかったが、間葉系細胞に特有の中間径フィラメントである Vimentin は陽性であった。

もう一つの葉状腫瘍樹立細胞である Phyllodes #2 は、細長い突起を有する不整形な細胞形態を示し、増殖は早い細胞株である (図 4(2)-40)。この症例の針生検材料で HER2、ER、PgR は陰性であり、細胞株においても HER2、ER、PgR 陰性が免疫染色により確認された (図 4(2)-41)。また、上皮マーカーの免疫染色の結果、AE1/AE3 陰性であり、Phyllodes #1 同様に vimentin 陽性を示した (図 4(2)-42)。上記のような悪性葉状腫瘍についての細胞株は世界でもほとんど例を見ず、機能解析による治療不応答性などの解析にも有用と考えられる。

ヒト乳がん細胞株の樹立は一般的には困難であるとされてきたが、近年、培地の改良、血清の安定化、種々の増殖因子の解明などの培養に関する技術の向上が格段と進歩し、乳がん由来の細胞株の樹立が報告されている。これらの報告例または、市販されている乳がん培養細胞株をみると原発巣由来の細胞株はごく少数であり、多くは胸水由来の細胞株である。今回樹立した細胞は、葉状腫瘍については、2 例とも転移巣から摘出された組織由来の細胞株、また、7 例の乳がん細胞株については、2 例が胸水由来であるが、他の 5 例は、原発巣由来の培養細胞株である (図 4(2)-43)。樹立した細胞株についてはその特性の検討のため、それぞれ RNA を抽出し、Affymetrix 社のマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行っている。cDNA 合成から、cRNA 合成・標識までは一貫したキット (Affymetrix 推奨) を使用した。T7-transcription を用いて mRNA に特異的な cDNA を合成して、これを鋳型として cRNA を作製する。この時、cRNA 合成の材料であるシトシンとウラシルがビオチンでラベル化されており、cRNA がビオチン標識される。ビオチン標識した cRNA を断片化後、専用のハイブリダイゼーションオープンを使用して、Gene Chip[®] アレイにハイブリダイズさせた。Fluidics Station (自動洗浄染色装置) を用いて、アレイを洗浄後、ビオチンと抗ビオチン抗体 (蛍光色素で標識されている) を結合させ、専用のスキャナーを用いて、アレイをスキャニング後、画像情報から得られたシグナルを、専用の解析ソフトを用いて数値化した (図 4(2)-44)。今回樹立した培養細胞株については、臨床情報だけでなく、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析などの分子生物学的特性が付加されており、薬剤感受性ネットワークの検証だけでなく創薬に応用可能であると考えられる。

4-2-4-2. 樹立した乳がん培養細胞株を用いたターゲット遺伝子の検証

今回樹立したトリプルネガティブ乳がん培養細胞を用いて、本プロジェクトで同定したパクリタキセル感受性阻害遺伝子の検証を行った。ターゲット遺伝子として、本プロジェクトで同定したパクリタキセル感受性阻害遺伝子 Lxxx1 とそのパスウェイ上の遺伝子 Jxxx1, Jxxx2, および Exxx1 の感受性への影響について 96 穴プレートを用いたウェルベースでの実験で検討した。

Lxxx1, Jxxx1, Jxxx2 および Exxx1 の発現をそれぞれ siRNA でノックダウンし、48 時間のインキュベーション後に各種濃度のパクリタキセルを添加した。遺伝子導入は、 5×10^3 個のトリプルネガティブ乳がん培養細胞に、各ターゲットに対し 40nM の siRNA またはコントロールとして 40nM の non-target siRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) による reverse transfection 法で行った。パクリタキセル添加後 48 時間インキュベーションを行い、パクリタキセルに対する感受性を WST-8 試薬で測定し、コントロールに対する細胞生存率を求めた。コントロール (non-target siRNA) と比較して、Lxxx1, Jxxx1, Jxxx2 および Exxx1 に対する siRNA のトリプルネガティブ乳がん培養細胞における抗細胞効果 (パクリタキセル無添加) は、ノックダウン (トランスフェクション) 96 時間後でもほとんど認められなかった。一方、各種濃度のパクリタキセルに対する感受性は、コントロールに対し 30%~50%の細胞死促進作用が認められ、ターゲットとした遺伝子の発現を阻害することにより、有意なパクリタキセルによる細胞死の促進が認められた (図 4(2)-45)。今回同定した遺伝子群は、スクリーニングに用いた既存の乳がん培養細胞だけでなく、本プロジェクトで樹立した臨床症例由来の培養細胞株を用いた検証においても、パクリタキセルの感受性を阻害する遺伝子群であることが示唆された。

本プロジェクトでは、ヒトゲノムを網羅した siRNA ライブラリーを網羅的にスクリーニングして、その結果から選択基準や統計的な手法で一挙に標的を絞り込む方法とは異なり、まずパクリタキセル感受性、非感受性の患者組織のアレイ比較解析により、パクリタキセル感受性に関与すると考えられる遺伝子候補を予め選択して、セルアレイによる機能解析を行って、ヒットした遺伝子のパスウェイ解析からネットワーク上で関連する遺伝子を再度広げて検索して、再選択した関連遺伝子のセルアレイによる機能解析を繰り返すことによって、パクリタキセル感受性に真に関連している因子とそのパスウェイを絞り込む方法を試みた。結果的に大規模なアレイ解析や網羅的な siRNA スクリーニングによらず、既存抗がん剤感受性に関わる因子の絞り込みが可能であることを示すことができた。

4-3 パスウェイ解析を応用した機能性化粧品の開発（カネボウ化粧品）

中間評価では、健常人皮膚由来の初代線維芽細胞を用い、既知情報より選択した 331 遺伝子から紫外線感受性候補遺伝子として 22 遺伝子を見出したことを報告した。中間評価以降、①紫外線感受性遺伝子のターゲティングと化粧品産業への応用、②紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張、の大きく 2 つの方向性で研究を進捗させた。なお、ここでいう紫外線感受性遺伝子とは、その機能低下により細胞レベルでの紫外線感受性を変化させる遺伝子である。

本研究テーマは応用研究の位置付けにて、紫外線に対する皮膚の防御および修復機能を維持・向上させる有効成分開発のため、セルアレイによる細胞レベルでの遺伝子機能解析へのアプローチから開発ターゲットとなる紫外線感受性遺伝子を見出す技術開発である。

【研究成果概要】

紫外線は皮膚がんのリスクファクターのみならず、健常人の QOL 低下を招くシミ・シワに対する最大の環境要因である。したがって、高齢化社会を向え生涯にわたる美への社会的要請ならびにオゾン層破壊による紫外線量の増加を鑑みると、紫外線感受性遺伝子をターゲットする有効成分開発は化粧品業界にとって今後もとりわけ重要な課題である（図 4(3)-1）。また、技術的側面では動物実験への規制が強化される中、細胞レベルでターゲット遺伝子を探索する技術開発の有用性はますますその重みを増している。

今回、ターゲット遺伝子のひとつとして KB2 遺伝子を見出し、素材探索系構築まで進捗したことは、創薬のみならず化粧品開発に対しても遺伝子絞り込み技術が有用であることを実証したといえる。また、未報告の紫外線感受性候補遺伝子を選抜できたことは、化粧品業界において先駆的な成果であると考えられる。ただし、今後、科学・技術的な価値を十分確立するには、選択方法ではなく、選択された遺伝子の解析と対応するパスウェイの把握を行い、より広い応用を可能とする基盤技術を確立する必要があると考えている。

4-3-1 紫外線感受性遺伝子のターゲティングと化粧品産業への応用

高齢化社会を迎えて QOL 向上が望まれる中、いつまでも皮膚を美しく保つため、紫外線障害のリスクを軽減することは重要である。現状において最も有効な手段はサンスクリーンなどの日焼け止め化粧品と考えられるが、皮膚表面の防御アプローチだけでなく、皮膚内部の細胞機能を制御し、紫外線障害を防ぐ新たなアプローチが求められている。そこで、本研究では紫外線照射時に働く多数のパスウェイならびに遺伝子の機能・役割について理解を深め、紫外線障害の予防・診断・改善法の開発に資するターゲット遺伝子（紫外線感受性遺伝子）の同定を目標とした。

これまでに文献情報等から、紫外線への基本的な応答である DNA 修復、細胞周期、アポトーシス等に関与する 331 遺伝子を選択し、セルアレイ技術を用いて紫外線照射後の細胞数を指標としたスクリーニングを実施したところ、発現抑制により細胞数を低下させる 13 の遺伝子が見出された。ここでは、紫外線感受性に関する検証実験結果等について報告する。

【実験方法】

<実験材料>

- ・ヒト皮膚線維芽細胞 Kanebo1（青年男子非露光部由来）
- ・Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) : SIGMA 社
- ・Lipofectamine RNAi Max : invitrogen 社
- ・HP GenomeWide siRNA : QIAGEN 社
- ・乳剤 (Autoradiography Emulsion, TypeNTB) : KODAK 社
- ・RNeasy Mini Kit : QIAGEN 社

- High-Capacity cDNA Archive Kit : Applied Biosystems 社
- TaqMan Universal PCR Master Mix : Applied Biosystems 社
- TaqMan Gene Expression Assays : Applied Biosystems 社
- 2 次抗体 (Goat Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase) : Jackson immunoresearch 社

<RNA 干渉>

コロニー形成試験の場合

- 線維芽細胞を 9×10^5 cells/well の濃度で 90-mm dish に播種。
- 37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養。
- Lipofectamine RNAi Max を用いて各 siRNA を細胞へトランスフェクション。

RNA 合成回復試験の場合

- 線維芽細胞を 5×10^4 cells/well の濃度で、カバーガラスを敷いた 35-mm dish に播種。
- 37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養。
- FBS 濃度を通常の 15%から 1%に落とし、3 日間培養。
- Lipofectamine RNAi Max を用いて siRNA をトランスフェクション。

<コロニー形成試験>

- siRNA のトランスフェクション 24 時間後に線維芽細胞を 1×10^3 、 2×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 cells/well で 60-mm dish に播種。
- 37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養。
- 市販の殺菌ランプ 3 本 を用いて約 50 cm 上方から 5、10 または 15 J/m² の紫外線(UVC) を照射、培養を継続。
- 約 14 日後にクリスタルバイオレットで染色後、形成されたコロニー数を計測。
- 紫外線非照射群のコロニー形成率を 100%とした時の各線量のコロニー形成率を求めた。

<RNA 合成回復試験>

- siRNA のトランスフェクション 48 時間後に線維芽細胞に 20 または 25 J/m² の紫外線 (UVC)を照射。
- 20 時間培養後、 $10 \mu\text{Ci/ml}$ の [³H]Uridine で 50 分間ラベル。
- カルノア液 (メタノール : 酢酸=3:1) で固定、乾燥後、カバーガラスをスライドグラスにオイキット液で細胞面を上側にして貼り付け、一晚乾燥。
- 翌日、スライドグラスを 5%TCA で 30 分間固定、流水で 2 時間洗浄後、一晚乾燥。
- 暗室にてスライドグラスを乳剤に浸し、4°C、暗箱中で一晚静置。
- 現像、ギムザ染色の後、オートラジオグラフィーで各細胞の核内に生じたグレイン (黒点) 数を測定。
- 紫外線非照射群のグレイン数を 100%とした時の紫外線照射群の割合を求め、RNA 合成回復率とした。

<mRNA 発現量解析>

- siRNA のトランスフェクション 24 時間後に線維芽細胞を 60-mm dish にサブコンフルエントになるよう播種 (コロニー形成試験の場合)。
- 37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養。
- RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出。

- High-Capacity cDNA Archive Kit を用いて cDNA を調製。
- cDNA 溶液を希釈し、TaqMan Universal PCR Master Mix および TaqMan Gene Expression Assays と混合し ABI PRIZM 7000 にて PCR 反応 (95°C 15 秒と 60°C 1 分の繰り返しで 40 サイクル)。
- 各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で補正を実施した。なお、RNA 合成回復試験の場合は細胞播種時にレプリカを作成し、紫外線照射の直前に total RNA を抽出した。

<ウェスタンブロッティング解析>

- siRNA のトランスフェクション 24 時間後に線維芽細胞を 75 cm² フラスコにサブコンフルエントになるよう播種。
- 37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養。
- 細胞を再度剥離し、RIPA buffer にてタンパク質を抽出。
- SDS-PAGE (8%)、PVDF メンブレンへの転写の後、抗体反応と化学発光により検出。

【実験結果】

中間評価以降、さらに補完的なスクリーニングを実施、計 22 個の候補遺伝子について発現抑制による紫外線感受性の上昇が認められた。この 22 遺伝子の紫外線感受性への関与を検証するため、細胞の生死をより厳密に判別するコロニー形成試験法¹⁾と RNA 干渉法を組み合わせた独自の評価を行った結果、特に 3 つの遺伝子 (KB1、2、3) をノックダウンした場合に (図 4(3)-2) 紫外線照射後の細胞死が顕著に誘導されることがわかった (図 4(3)-3)。このうち、KB1 および KB2 は紫外線による DNA 損傷の修復を担うヌクレオチド除去修復機構 (NER : Nucleotide Excision Repair) に関わる遺伝子であった。

NER にはゲノム全体の修復を担う GGR (global genome repair) と転写途中の DNA の修復を担う TCR (transcription-coupled repair) の 2 つの経路が一部の反応機構を共有し存在する (図 4(3)-4)²⁾。KB1 および KB2 は TCR に特異的な反応に関わる遺伝子であることから、GGR あるいは TCR に特異的な反応に関わる他の因子を含め、スクリーニング結果を再度分析したところ、興味深い知見が得られた。図 4(3)-5 に示すように TCR に特異的な反応に関わる遺伝子の発現低下は紫外線照射後の細胞数を低下させる傾向にある一方、GGR に特異的な遺伝子ではそのような傾向はほとんど見られなかった。実際、GGR 特異的な反応に関わる幾つかの代表的な遺伝子についてコロニー形成試験を実施したところ、予想通りこれらの遺伝子のノックダウンは紫外線感受性に顕著な影響を与えることはなかった (図 4(3)-6)。

NER に関わる遺伝子の機能欠損が知られている遺伝病 (色素性乾皮症やコケイン症候群など) は GGR および TCR 欠損に関わらず、いずれも顕著な光線過敏を示す³⁾。また、TCR 特異的な反応については、転写中の遺伝子に生じた DNA 損傷は当然のことながら転写を阻害するため、非転写領域の DNA 損傷に比して細胞への致命的な影響が大きく、早急な修復を担う合目的な反応経路として TCR が存在するとされる⁴⁾。

上記一連の結果は、TCR に特異的に関わる遺伝子に関してはその発現変動によっても紫外線感受性に影響を与えることを示唆している。これは TCR 活性の程度によって、同じ線量の紫外線に対する皮膚障害反応の強弱が異なる可能性を示しており、紫外線障害を防ぐ新たなアプローチを開発する上で非常に有益な知見と言える。すなわち、TCR に特異的な反応に関わる遺伝子をターゲットとし、その活性を制御することで紫外線障害の軽減を図るアプローチが考えられる。

そこで、KB1 および KB2 の発現低下による紫外線感受性の上昇が TCR の活性低下を介して引き起こされているのか調べた。紫外線により DNA 損傷を受けると細胞は通常の活動を停止し、DNA を修復した後活動を再開する。したがって、紫外線照射によって停止した RNA 合成能の一定時間後の回復を指標とすることで、転写途上の DNA 修復の程度、つまり TCR 機能を評価

することができる (RNA 合成回復試験)⁵⁾。この RNA 合成回復試験と RNA 干渉法を組み合わせた独自の評価系を構築し、解析を行ったところ、図 4(3)-7 に示すように KB1 および KB2 共にノックダウンにより RNA の合成回復に遅延が認められた。

一方、図 4(3)-8 に示すように GGR 特異的の反応に関わる遺伝子のノックダウンでは TCR 活性はほとんど影響を受けず、KB1 および KB2 の発現低下が TCR 機能を介して紫外線の感受性に影響を及ぼすことが強く示唆された。また、KB2 が KB1 に比べ TCR 活性により顕著な影響を与えていることが明らかとなった。

以上の結果に基づき、化粧品への展開という視点で KB2 をターゲットとした素材探索を優先的に実施すべく評価系の構築に着手した。これまでに KB2 発現増強のポジティブコントロールとなる薬剤の論文調査を終了し、KB2 発現増強作用を遺伝子レベルで検証する傍ら、タンパク質レベルでの評価を目指し Western 法に最適な抗体を数種の市販品から選定した (図 4(3)-9)。今後、短期的開発視点では植物エキストラライブラリーから、中長期的開発視点では化合物ライブラリーから素材スクリーニングを開始する。

【今後の展開】

KB2 の発現を増加させる化粧品素材を開発し、紫外線障害に対する新たな防御を可能とする化粧品への応用を目指す。

参考文献

- 1) KH. Kraemer. *et al.*, *Arch.Dermatol.*, **130**, 1018 (2000)
- 2) PC. Hanawalt. *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 958 (2008)
- 3) S. Moriwaki. *et al.*, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **17**, 47 (2001)
- 4) A.van Hoffen. *et al.*, *Toxicology.*, **193**, 79 (2003)
- 5) M. Yamaizumi. *et al.*, *Oncogene.*, **9**, 2775 (1994)

4-3-2 紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張

4-3-2-1 セルアレイサイクルによる紫外線感受性候補遺伝子の探索

紫外線感受性候補遺伝子の一次スクリーニング実験では、紫外線照射後に応答する皮膚細胞内のプロセス (DNA 修復、細胞周期、アポトーシスなど) に関わることが報告されている遺伝子群を対象とした。ここでは、一次スクリーニングで得た紫外線感受性候補遺伝子と相互作用する遺伝子群をバイオインフォマティクス (BioIT) ツール等を用いて新たに抽出し、紫外線との関連が未報告な新規紫外線感受性遺伝子のターゲティングを目的とした。

【実験方法】

- ・ BioIT ツールであるメタコアを用い auto-expand one interaction shortest path にて、前述の一次スクリーニングで得た 22 の紫外線感受性候補遺伝子との相互作用が報告されている 656 遺伝子を抽出。
- ・ 公共データベース、DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery : <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) により、Homo sapiens の遺伝子として登録されている 634 遺伝子に絞込み。
- ・ マイクロアレイ解析の結果から、634 遺伝子のうち 282 遺伝子が線維芽細胞での発現が検出されない、あるいは極めて低発現であるため、それらを削除し評価対象遺伝子を 352 遺伝子に絞込み。
- ・ 一方、これとは別のマイクロアレイ解析から、表皮細胞において紫外線照射後に発現誘導さ

れる 2674 遺伝子を紫外線応答遺伝子として抽出。

- ・このうち 46 遺伝子は先ほど削除した 282 遺伝子に含まれていたことから、それらを 352 遺伝子に追加。
- ・最終的に二次スクリーニングの評価対象遺伝子群として 398 遺伝子を確定。
- ・前述の一次スクリーニングと同様のスキームにて、発現抑制により紫外線感受性を上昇させる遺伝子を探索。

【実験結果】

再現性確認も含めた解析の結果、新たに紫外線感受性候補遺伝子として 42 遺伝子が見出された。これらにはアンドロゲン受容体や NF κ B シグナル、また細胞外マトリクスやプロテアソームなどに関連する遺伝子が含まれており、コロニー形成試験法で検証した結果、実際に発現抑制により紫外線感受性が高まる遺伝子が存在した。この中には紫外線との関係が未報告の遺伝子が含まれており、新規紫外線応答パスウェイの解明の糸口になると考えられた (図 4(3)-10)。

【今後の展開】

紫外線との関係が未報告の遺伝子の紫外線感受性への寄与度を評価し、化粧品産業への応用展開を検討する。

4-3-2-2 新規メラニン生成パスウェイ探索への応用

メラニンの生成(メラノジェネシス)は、周囲の様々な環境の変化により亢進、あるいは低下する。特に、皮膚における最大の環境要因である紫外線は、直接的に、あるいは周囲の細胞からのサイトカイン等の分泌を介し間接的にメラノサイトを刺激する⁶⁾。このような、紫外線をはじめとした刺激とメラノジェネシスとを結ぶ細胞内シグナル伝達系は、メラノサイト研究の主要な課題となっている⁷⁾。一方、メラノジェネシスはメラニン生成とともに、周囲の表皮細胞にメラニンを受け渡すために特徴的な樹状突起形成を伴うが⁸⁾、これまでこの形態変化に関与する細胞内シグナル伝達系を網羅的に解析した例はない。そこで、本研究ではセルアレイ解析に基づく紫外線とメラノジェネシス、特に樹状突起形成に関わるシグナル伝達系の包括的な解析から、化粧品素材開発のターゲットとなる遺伝子の探索を目標とした。ここではセルアレイ解析のメラノサイトへの応用に向けた基本プロトコールの検討結果について報告する。

【実験方法】

<実験材料>

- ・ Normal Human Epidermal Melanocyte
- ・ 改変 MCDB 培地
- ・ 570 well Poly-L-Lysine コートスライドガラス：松浪硝子工業
- ・ Turbocapture 8 mRNA kit：QIAGEN
- ・ CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, 2 μ M：Invitrogen 社
- ・ SlowFade®：Invitrogen 社
- ・ Lipofectamine RNAi MAX：Invitrogen 社
- ・ Tyrosinase siRNA (HSS111091, HSS111092, HSS111093)：Invitrogen 社
- ・ Non-target siRNA (Universal Negative Control, medium)：Invitrogen 社

<固相リバーストランスフェクション>

- ・ siRNA-トランスフェクション試薬コンプレックスを調製。
- ・ ECM 成分とともに 96-well プレートに固相化。

- ・使用時まで乾燥保存。
- ・メラノサイトを 1.0×10^3 cells/well にて播種。
- ・培養後、Total RNA 抽出。
- ・cDNA 合成後、リアルタイム PCR 解析(ABI PRISM7000)。

<アレイチップ上での細胞蛍光標識、画像解析による数値化>

- ・メラノサイトを 1.5×10^5 cells/chip にて播種。
- ・培養後、CFSE を含む PBS で 15 分間処理。
- ・培地交換後、3 時間培養。
- ・細胞を 4% PFA で固定。
- ・TO-PRO-3 ($1 \mu\text{g/mL}$)、RNase ($1 \mu\text{g/mL}$)で 30 分間処理。
- ・封入 (SlowFade®)。
- ・共焦点レーザー顕微鏡で画像取得。
- ・画像解析ソフト Image Pro を用い、細胞面積、および細胞周囲長を、TO-PRO-3 シグナルから細胞数を測定。

【実験結果】

固相リバーストランスフェクションにより Tyrosinase siRNA を処理した細胞は、Non-target siRNA を処理した細胞と比較し、Tyrosinase 遺伝子発現が顕著に低下しており(図 4(3)-11)、本法のメラノサイトへの応用が可能であった。また、この 96 well プレートを用いることにより、細胞形態だけでなく、培養上清や細胞成分を評価する実験系への展開が期待できた。

また、アレイチップを用いることにより、メラノサイトを蛍光標識し、画像解析による細胞形態の数値化手法が確立できた。このことから、メラノサイトの樹状突起形成に関わるシグナル伝達系を細胞形態変化を指標に、定量的、かつ大規模に評価することが可能になると考えられた(図 4(3)-12)。今後、メラノサイトの形態変化を誘導するための細胞培養、紫外線照射条件を詳細検討後、メラノサイトの樹状突起形成に関わるシグナル伝達系を解析予定である。

【今後の展開】

メラノサイト樹状突起形成に関わるシグナル伝達パスウェイとその鍵となる遺伝子を同定し、化粧品産業への応用展開を検討する。

参考文献

- 6) Imokawa (2004) *Pigment Cell Research*. 17:96-110
- 7) Tachibana (2000). *Pigment Cell Research*. 13:230-240
- 8) Scott *et al.* (2005) *Experimental Cell Research*. 304:407-416

4-4 一細胞時系列計測に基づく遺伝子探索の実用性の評価（産業技術総合研究所 セルエン エンジニアリング研究部門（RICE）（つくば）レスー氏グループ）

【中間評価までの概要】

一細胞時系列計測に基づく遺伝子探索の実用性を評価するために、本グループが独自に開発したがん細胞不死化レポーターを指標としてがん抑制標的遺伝子を探索し、評価すべき遺伝子を同定した。具体的には、正常細胞において細胞質全体、がん細胞や不死化細胞においては核周辺に局在を示すモータリンタンパク質をレポーターとして用いた。モータリン染色を用いた抗がん shRNA の4回のスクリーニングにおいて、候補遺伝子を9つ同定した。さらに6種類のがん細胞を用いて、これらの9つの候補遺伝子が p53 及び p16 腫瘍抑制経路を誘導するかを検証した。我々の抗がん shRNA スクリーニング及び CGH スクリーニングの結果を合わせると、最終的に4つの候補 shRNA を同定することができた。4つの標的のうちの3つは p16 腫瘍抑制経路を誘導した。バイオインフォマティクス手法を用いたパスウェイ解析によると、この3つの標的は DNA 損傷シグナリングパスウェイと関連性があった。

【中間評価以降の研究進捗の概要】

今日まで数多くのがん細胞についての細胞生物学的研究が行われ、様々なことがわかってきてはいるが、最も重要とされるがんの早期発見がなされた場合でも完治率は決して高いとは言えない。それ故に、がんの発生を抑制し、さらに運悪く発がんに至った場合でもそれを治療することのできるような方法や薬などの研究開発に多くの研究者が取り組んでいる。

我々は、新しい抗がん治療法として、一つの遺伝子レベルではなく、複雑なパスウェイレベルでの発現解析を含む多次元アプローチを用い、治療ターゲットと成りうるコア遺伝子を同定することは非常に重要であると考え、がんに対する下記の新しい創薬ターゲットの探索を行った。

1. 遺伝子サイレンシングやがん細胞の遺伝子解析などの二重重複アッセイによるがん遺伝子ターゲットの探索
 - (i) 遺伝子サイレンシングしたがん細胞のモータリン染色の局在変化および(ii) がん細胞CGH解析のコンビネーションを用いて、我々は抗がん標的となる3つの候補遺伝子を同定した。興味深いことに、3つの遺伝子は一つのパスウェイ（DNA損傷応答パスウェイ）に関連していた。最新のバイオインフォマティクス解析により、我々のスクリーニングシステムでさらに2つの遺伝子が同定され、同じパスウェイに関連していることが証明された。遺伝子サイレンシングおよびゲノム解析を含む連携スクリーニングシステムは強力に信頼できるツールであり、DNA損傷シグナリングパスウェイはがん標的の候補であると示唆された。
2. がん細胞の選択的壊死を誘導する薬剤に関与するがん遺伝子ターゲットを遺伝子サイレンシングを介した抑制により探索

遺伝子サイレンシングスクリーニングとパスウェイ解析により、アシュワガンダ抽出物の選択的がん細胞壊死に関与する遺伝子としてp53、Bcl2、Bclxlを同定した。さらに、アシュワガンダ抽出物が選択的ながん細胞を壊死へと導く過程において、p53、Bcl2、Bclxlがどのように関与するか分子学的に解析している。また、外因性レポーターとi-Extractの精製化合物を用いたリアルタイム解析により分子学的に解明し、適用性のバリデーションを進める（徳元氏、堀本氏との共同）。
3. 薬剤耐性を誘導する遺伝子発現によるがん遺伝子ターゲット探索

がん細胞の薬剤耐性に関与するタンパク質として、BST2を同定した。さらに最近、我々は*in vitro*および*in vivo*アッセイにより、BST2ががん細胞の悪性転換や転移において決定的な役割を担い、これが薬剤耐性表現型に強く関与していることを明らかにした。細胞表面タンパク質であるBST2が、非常に有用な抗体療法の候補標的であると示唆された。

【研究の位置づけ】

一細胞時系列計測に基づく遺伝子探索の実用性を評価するために、我々の考案したターゲット遺伝子を絞込み、機能の詳細な解析を行い、評価すべき遺伝子を同定する。

【科学的・技術的視点】

我々がを行っている創薬ターゲット探索は、細胞、バイオインフォマティクス、ゲノム解析、時系列解析などの技術を統合した研究であり、探索アプローチは創薬の基盤技術になると考えられる。

この10年間で、効果的ながん治療法を設計し開発する手法は1つではない事が明らかになっている。さらに、新しいがんマーカー、がんターゲット遺伝子、抗がん剤の探索を行うために多次元のアプローチが考えられている。現在の世界的ながん研究における目標は、(i) 早期診断もしくは予後診断における有用な新規分子マーカーの同定、(ii) 候補となる治療ターゲットの同定、(iii) バイオインフォマティクス、実験、コンピュータを用いたアプローチの統合によるがんに対する治療介入の促進である。これらの目標を達成するためには、一つの遺伝子レベルではなく、複雑な経路レベルでの発現解析を含む多次元アプローチを用い、治療標的と成りうるコア遺伝子を同定することは非常に重要であり、これまででない試みである。

【研究成果】

我々はがんに対する新しい創薬ターゲットの探索のために下記に示す3次元アプローチに着手した。

- 1) 遺伝子サイレンシングやがん細胞の遺伝子解析などの二重重複アッセイによるがん遺伝子ターゲットの探索
- 2) がん細胞の選択的壊死を誘導する薬剤による遺伝子サイレンシングを介したがん遺伝子ターゲット探索
- 3) 薬剤耐性を誘導する遺伝子発現によるがん遺伝子ターゲット探索

我々は遺伝子、遺伝子発現、薬剤耐性アッセイを含む多次元のアプローチが新規の遺伝子ターゲットおよび創薬モデルとして利用できるパスウェイの同定を導くと予測した。

第一の方法として、我々は遺伝子サイレンシングにより4種類のヒト乳がん細胞を老化へと誘導させた。モータリンタンパク質の細胞分布は正常細胞において細胞質全体、がん細胞や不死化細胞においては核周辺に局在しており、がん細胞を細胞老化へと誘導することで核周辺領域から細胞質全体へと移動する。乳がん細胞を老化へと誘導するターゲット遺伝子を同定するために、この特性をレポーターとして用いた(図4(4)-1)。

ヒトがん細胞(骨肉腫U2OS、乳がんSKBR3、T47D、MDA-MB231、MDA-MB157、胆嚢がんTGBC-2、SKCH)はダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、Gibco)に10%のウシ胎児血清(FBS)を加えた培養液中で、加湿CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)の環境で培養した。以前の報告(Wadhwa, et al (2005) *Biochem. J.* 391:185-190)と同様に、U6発現ベクターに組み込んだshRNAを細胞(50-60%密集度)に遺伝子導入した。細胞を96ウェルプレートに移し、70%密集度の時点で50 ngのプラスミドDNAをLipofectamine2000(インビトロジェン)によってその使用説明書通り遺伝子導入した。遺伝子導入から24時間後にピューロマイシン(2 μg/mL)による細胞選

扱を 48-72 時間かけて行った。続けて通常の培養液中で 48-96 時間培養したのち、細胞をメタノール：アセトン（1:1）で固定した。固定した細胞をモノクローナル抗モータリン抗体で 1-2 時間処理し、2 次抗体の抗マウス IgG（アレクサ 488：Molecular Probes、EugenemOR）で細胞染色した。処理後、細胞を自動走査型顕微鏡（Axiovert、200M、ZEISS）で観察した。768 種の shRNA を用いたスクリーニングを 4 回行った結果、モータリン染色が核周辺から細胞質全体へと変化した 23 種の shRNA を抗がん候補遺伝子として同定した（表 1、図 4(4)-2-①A）。

表 1 List of the candidate anti-cancer siRNAs

Sr. No.	Gene name	Accession No.	Evidence for role in carcinogenesis/ Function
1	BRCA1	NM007294-1	DNA damage response
2	MRE11	NM005590-1	DNA damage and telomere maintenance
3	NBS	NM002485-2	DNA damage and telomere maintenance
4	TNPO1	NM002270-1	Nuclear import of proteins
5	TNPO2	NM013433-2	Nuclear import of proteins
6	TNPO3	NM012470-2	Nuclear import of proteins
7	MDC1	XM376479-1	Maintain genome integrity
8	TINF2	NM012461-2	Telomere length regulation
9	IRAK1	NM001569	Systemic lupus erythematosus
10	RIPK3	NM006871	Immune response
11	TP53BP1	NM005657-1	Associated with squamous cell carcinoma
12	BIN1	NM004305-1	Downregulated in cancer
13	BCL2A1	NM004049	Upregulated in cancers
14	MAP3K7	NM145333	Upregulated in cancers
15	MAPK1	NM002745	Upregulated in cancers
16	TERT	NM003219-2	Upregulated in cancers
17	Gp96	NM003299-1	Upregulated in cancers
18	TNKS1BP1	NM033396-1	Upregulated in cancers
19	IL1A	NM000575-1	Upregulated in cancers
20	KPNA2	NM002266-2	Upregulated in cancers
21	CALR	NM004343-1	Upregulated in cancers
22	USP10	NM005153-1	Upregulated in cancers

これらを立証するために、(i) 24 種類の乳がん細胞株の CGH 解析により出力されたデータと統合し、増幅が確認された遺伝子座に局在する遺伝子について詳細に調べた（図 4(4)-2-①B）。(ii) 乳がん由来ではないがん細胞を用いて細胞型特異性を除外するための解析を行った。(iii) バイオインフォマティクス手法を用いて選択した遺伝子ターゲットのパスウェイ解析を行った。このような遺伝子発現解析、ゲノム解析およびバイオインフォマティクスのコンビネーション法を行うことにより、6 種の遺伝子ターゲットが同定され、それらが DNA 損傷シグナリングと呼ばれる一つのシグナリングパスウェイに関連していることを証明した（図 4(4)-2-②、4(4)-3）。

注目すべき点は、ごく最近の研究において、DNA 損傷ががんの主要因であることが分かってきている。DNA 損傷シグナリングは修復、耐損傷や細胞周期チェックポイントの複雑な機構に関与している。CGH 解析および遺伝子サイレンシング解析により得られた我々のデータは、DNA シグナリングががん細胞において極めて重要な生存因子であることを証明できる。さらに、我々の結果は DNA 損傷シグナリングの機構崩壊はあるがん細胞においては p53 腫瘍抑制パスウェイをまた他のがん細胞においては p16INK 腫瘍抑制パスウェイを活性化させ、がん細胞の増殖を抑制させることを明らかにした。また、これらのデータはがん治療における治療戦略として、DNA 損傷パスウェイの崩壊の下流エフェクターである p16INK を強調している。我々はがん細胞における DNA 損傷シグナリングの機構崩壊が p16INK の活性化を誘導し、増殖抑制および老化へと導く事を初めて示した (図 4(4)-2-②、4(4)-3)。

2つ目の方法として、我々は選択的にがん細胞を壊死させる生薬のモデルとしてアシュワガンダの葉より抽出された植物化学物質を用いた。アシュワガンダ (ウィザニア ソムニフェラ) はナス科の常緑低木であり、インドの伝統医学アーユルヴェーダで広く使用されている。我々は初めてアシュワガンダの葉から有効成分を抽出、精製し、抽出物がヒトがん細胞に対して抗がん活性を有すること、特に、がん細胞を選択的に壊死させることを明らかにした。さらに、遺伝子サイレンシング法を用いて、がん細胞の選択的壊死が p53 パスウェイの活性によって起きていることを証明した。本プロジェクトのもと、化学的な情報やバイオインフォマティクス手法を用いたパスウェイ解析から得られた情報を組み合わせることによって、アシュワガンダ葉抽出物およびその化合物によるがん細胞選択的壊死に参与するコアターゲットおよびパスウェイを同定した (図 4(4)-4、4(4)-5、4(4)-6)。

アシュワガンダ葉抽出物の有効成分を分離するために、葉は空気乾燥後に粉末化し、以前の報告 (Widodo, et al (2008) *Cancer Lett.* 262: 37-47) と同様に、ソックスレー装置中で4-5日かけてメタノール (60°C) 抽出を行った。以前にがん細胞選択的殺傷能が示されたエーテル抽出物は、Purif-a2 精製装置 Purif-Pack カラム (SI 30 mM, SIZE: 60 (Moritex Co.)) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分極で分離した。模式図 4(4)-5 に示すように、溶媒はヘキサンおよび酢酸エチル (AcOEc) を用いて 15 mL/min の流速で処理した (ステップ I)。はじめに、成分は3画分 (低、中、高分極) に分離した。さらにステップ II で中分極成分をヘキサン/酢酸エチル 50/50 から 10/90 の勾配によって低分極、高分極側に分画した。ステップ I と II で回収した低分極画分は1つにまとめ (画分1)、ステップ II の高分極画分は結晶とフィルター画分に分離した (ウィザノン、i-Factor として同定)。ステップ I で回収した高分極成分はヘキサン/酢酸エチル 25/75 から 0/100 の勾配で分離した (ステップ III)。ステップ III で回収された低分極成分をさらにヘキサン/酢酸エチル 50/50 から 0/100 の勾配で低 (画分#3)、中 (ウィザフェリン)、高分極成分 (画分#4) に分けた。ステップ III の分極成分は分画#5 とした。この手法によって i-Extract を画分#1 から#5、ウィザフェリン A、ウィザノンの7分画化に成功し、それらのがん細胞殺傷活性、細胞増殖抑制能、シグナル伝達経路、モーター細胞内分布変化、そして p53 活性を解析した。シグナル伝達経路解析により、我々は p53 および Bcl-2/Bcl-xL が中心的な標的遺伝子であることを同定した。さらに上記を遺伝子発現解析、リアルタイム解析、阻害剤法を駆使して立証した。AP-1 レポーターアッセイを利用したリアルタイムおよび阻害剤実験で、アシュワガンダ葉抽出物は AP-1 パスウェイを活性化することを確定できた。さらに、バイオインフォマティクスおよびシグナル伝達経路解析によって、これらの遺伝子標的らが DNA 損傷修復シグナルに強く関与するものであるという、上記のことを裏付けるものであった (図 4(4)-6)。p53 と AP-1 の両因子ともに DNA 損傷修復シグナルの下流因子であり、DNA 損傷に対する細胞応答における根幹に位置する。注目すべきは、上記の独立した2つの実験系によって DNA 損傷シグナルががん治療の重要な標的になるということが示されたことである。

3つ目の方法として、我々はがん治療を困難にさせている非常に重要な要点である薬剤耐性に注目した。不死化初期で悪性化していない細胞に対してレトロウイルスベクターによって cDNA 発現ライブラリーを導入し、薬剤耐性を持つ細胞を作製した。DNA 毒およびトポイソメラーゼ阻害剤（ドキシソルビシン、エトポシド、カンプトテシン）、抗代謝産物（フルオロウラシル）、微小管毒および有糸分裂阻害剤に対する耐性を示した細胞を選択した。薬剤耐性を示した細胞から導入された cDNA を同定し、がん細胞の薬剤耐性の原因となる遺伝子の特定を進めた（図 4(4)-7）。

結果として BST-2 が有力な候補として同定した。続いて In vitro ならびに In vivo における BST-2 が薬剤耐性の標的であるか検討した。これまでのところ、BST-2 は細胞の防御機構に関わる細胞表面タンパク質として知られている。我々は BST-2 の役割を検証するため、コロニー形成アッセイによるヒトがん細胞の悪性化、およびヌードマウスにおけるがん転移・腫瘍形成能を解析した。細胞形質転換アッセイは Cell Transformation Detection Assay キット（CHEMICON）をメーカー使用説明書に従って行った。ベース寒天溶液（0.8%寒天入り培養液）およびトップ寒天溶液（0.4%寒天入り培養液）を準備し、37°Cで予温した。24 ウェルプレートベース寒天溶液でコーティングし、37°Cインキュベーターで5分間温めた。同細胞数の対照細胞と BST-2 過剰発現細胞（1 ウェルあたり 1,250 細胞）をトップ寒天溶液に混ぜた後、ベース寒天の上に重層した。週2回細胞培養液を与え、37°Cの 5%CO₂ インキュベーターで培養した。28日目にコロニーを細胞染色液で検出した。コロニー形成活性は5区域中の平均コロニー数を3回の独立した実験で測定した。がん転移能測定には、走化性アッセイを行って対照と BST-2 過剰発現細胞を比較した。60-70%密集度の細胞を冷 PBS で洗浄し、トリプシンで細胞（2×10⁵ 個/mL）を遊離させた後 0.5%BSA（Sigma）入り DMEM に再懸濁した。2×10⁴ 個の細胞を Transwell inserts（12 mm-pore、Costar）に撒き、メーカー取扱説明書に従ってがん浸潤アッセイを行った。ヒトフィブロネクチン（Sigma）を誘導因子として用いた。Transwell を通過した細胞は 4%ホルムアルデヒド/PBS で固定し、0.2%クリスタルバイオレット/PBS で染色した。腫瘍形成能アッセイは、0.3 mL の培養液に懸濁した対照ならびに BST-2 過剰発現細胞（1×10⁶ 個）を Balb/c ヌードマウス（4週令メス、日本クレア）の両脇腹の皮下に注射して行った。腫瘍形成の様子は 6-8 週間かけて観察した。腫瘍が現れて急速に成長した場合を陽性とした。薬剤耐性アッセイは、96 ウェルプレートそれぞれに 1×10⁴ 個の対照または BST-2 過剰発現 MCF7 細胞を撒き、5%FBS を含む培地で培養した。細胞がほぼ 100%密集度に達した時点でノコダゾール、エトポシド、ウィザフェリン A、タキソール、5-FU、およびクルクミンをそれぞれ段階的な投与量で処理した。48 時間後に薬剤入りの培養液を取り除き、5%アラマーブルー入り培養液をウェルに加えた。37°Cで4時間飼育後、マイクロプレートリーダー（595 nm）で検出した。すべてのアッセイは3回の独立した実験で行った。生細胞の数は同様にアラマーブルーを処理した、薬剤無処理細胞に対する比率で計算した。

我々は初めて、BST2 が悪性転換、転移、がん細胞の薬剤耐性に関与していることを実証した（図 4(4)-8、4(4)-9、4(4)-10）。データベースおよびバイオインフォマティクス解析により、我々は BST2 が Ras パスウェイを経由した DNA 損傷シグナリングに関連し、細胞間接着シグナリングを制御していることも明らかにした。MRN 複合体の検出により認識された DNA 損傷は Ras パスウェイが活性化され、さらに細胞接着分子である NCAM、PCAM、BST2 への活性化と繋がっていく（図 4(4)-11）。

この3次元アプローチにより、がん治療のためのコア遺伝子ターゲット候補として DNA 損傷および細胞接着シグナリングパスウェイが同定された。

第5章 総合調査研究および集中研の活動（バイオインダストリー協会）

バイオインダストリー協会（JBA）は、総合調査研究として、①海外調査および②委員会等の開催事務を行った。また、③集中研（JBA 分室）の設置と運営を行い、本事業に参加した研究者にセルアレイ（細胞アレイ）用の実験・解析システムを提供した。

5-1 海外調査報告

本プロジェクトにおいて開発する諸技術に関して、国内外の競合技術、ニーズおよび参考となる関連技術の調査を行った。初期は細胞内ネットワークの大規模解析に関する情報と併せて、画像データの扱いおよびネットワーク推定に関して情報を収集した。後期は競合技術とニーズに重点を置いた。

本調査は研究推進委員会委員（実施者）である次の6氏に委託して行った。

海外調査を委託した研究推進委員会の委員（所属は当時）

- | | | |
|--------|---------|---|
| ・平野 隆氏 | 産業技術研究所 | セルエンジニアリング研究部門 |
| ・三宅正人氏 | 産業技術研究所 | セルエンジニアリング研究部門 |
| ・藤田聡史氏 | 産業技術研究所 | セルエンジニアリング研究部門 |
| ・富永大介氏 | 産業技術研究所 | 生命情報科学研究センター
(現：生命情報工学研究センター) |
| ・秋山 泰氏 | 産業技術研究所 | 生命情報科学研究センター長
(現：東京工業大学大学院 情報理工学研究科教授) |

5-1-1 出張先

H17年度

1. Keystone Symposia 出席（Vancouver, Canada）

- ・出張者：藤田聡史、期間：H18年1月29日～2月5日
- ・目的：細胞内ネットワーク、細胞内シグナル伝達経路の大規模解析に関する情報収集

2. ISBMDA（6th International Symposium on Biological and Medical Data Analysis）出席 出席（Aveiro, Portugal）

- ・出張者：富永大介、期間：平成17年11月8～13日
- ・目的：画像データベースの構築と運用の実例等の情報収集

3. 研究機関訪問

1) Novartis Pharma AG 研究所（Basel, Swiss）

2) Helsinki 大、バイオテクノロジーセンター（VTT Technical Research Center）（Turku, Finland）

- ・出張者：平野 隆、期間：H18年1月8～13日
- ・目的：細胞アレイおよびゲノムアレイに関する先端研究動向調査

H18年度

4. CASP7（7th Community Wide Experiment on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction）出席（Pacific Grove, CA, USA）

- ・出張者：秋山 泰、期間：H18年11月26～30日

- ・目的：タンパク質立体構造予測を経て機能やネットワーク推定を行う解析技術の調査

5. APBC2007 (The Fifth Asia-Pacific Bioinformatics Conference) 出席 (香港大学、香港)

- ・出張者：富永大介、期間：平成 19 年 1 月 14～18 日
- ・目的：遺伝子発現データの処理法、そこからの情報抽出とネットワーク解析法の調査

H19 年度

6. 研究機関訪問およびシンポジウム出席

- 1) Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA)
- 2) CHI 4th In vitro molecular imaging、CHI 4th In vivo molecular imaging (San Diego, CA, USA)

- ・出張者：三宅正人、期間：平成 19 年 11 月 25 日～12 月 2 日
- ・目的：1) 創薬基盤技術ニーズ調査、2) 競合技術の調査

7. 研究機関訪問

- 1) Max Plank 研究所 (Berlin, Germany)
- 2) European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Heidelberg, Germany)
- 3) Danone Research (Palaiseau Cedex, France)

- ・出張者：三宅正人、期間：平成 20 年 1 月 6～12 日
- ・目的：1) ニーズおよび競合技術の調査、2) & 3) ニーズ調査

H20 年度

8. SCAW (The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis) 出席 (Zurich, Switzerland)

- ・出張者：秋山 泰、期間：平成 20 年 9 月 10～14 日
- ・目的：コンピューター科学、数学およびインフォマテクスを用いた解析技術の動向調査

9. CHI, Discovery on Target 出席 (Boston, USA)

- ・出張者：三宅正人、期間：平成 20 年 10 月 19～25 日
- ・目的：siRNA を用いた標的同一化技術の動向調査

10. 研究機関訪問および Meeting 出席

- 1) Genentech 社 (San Francisco, USA)
- 2) ASCB 48th Annual Meeting (アメリカ細胞生物学会) (San Francisco, USA)
- 3) The Scripps Research Institute (San Diego, USA)
- 4) Burnham Institute for Medical Research (San Diego, USA)

- ・出張者：藤田聡史、期間：平成 20 年 12 月 12～21 日
- ・目的：1、3 & 4) ニーズおよび競合技術の調査、
2) 細胞構造および遺伝子発現時系列測定に係る研究と開発動向の情報収集

H21 年度

11. EMBO meeting 出席および研究機関訪問

- 1) EMBO meeting (Amsterdam, Netherlands)
- 2) Wageningen University (Agrotechnology & Food Sciences) (Wageningen, Neth.)

- ・出張者：藤田聡史、期間：H21 年 8 月 28 日～9 月 4 日

- ・ 目的： 1) 一細胞時系列解析技術等のニーズ調査、 2) 関連のアレイ技術調査

5-1-2 調査結果

1. Keystone Symposia

- ・ **Signaling Networks** (即ち、細胞内ネットワークと細胞内シグナル伝達経路の大規模解析等) に関するミーティングであり、セルアレイ法および創薬ターゲット遺伝子の解析手法と結果が発表された。

- ・ **Harvard (White Head Institute) の David Sabatini らのグループ** (細胞アレイの分野で世界最先端) は細胞アレイシステムを用いたネットワーク解析システムについて MIT と 共同研究を行っており、“生物関連の研究”は Harvard、“画像解析と In silico 分析”は MIT の分業とし、強力なコンピューター科学者を多数抱えて進めていた。

A) 生物関連の研究について: レンチウイルスを用いた Cell Array 研究にシフトしており、Mouse ES cell にも 36% の効率で遺伝子導入できた。また、このシステムを用いて 4500 ターゲット/月のアッセイが可能であった。尚、日本ではレンチウイルスをアレイプリンターに用いることは困難 (施設が必要) である。

レンチ shRNA ライブラリーを用いて、Kinome スクリーニングを種々の細胞で実施していた。がんをターゲットとしたスクリーニングも進行中であった。また、FACS を用いたセルソーティングによる細胞表現型解析手法も提案していた。

B) 画像解析と In silico 分析について: 画像解析システム (Cell Profiler™) を開発していた。細胞染色により、密集した状態の細胞でも分離して認識が可能である。時系列解析についてはコメントが無かった。

2. ISBMDA (6th International Symposium on Biological and Medical Data Analysis)

- ・ 講演「**Biomedical Image Processing Integration through INBIOMED**」で開発中のデータベースは本 NEDO プロジェクトで検討中のものと構造が類似していたので、発表者 (Perez del Rey, Universidad Politecnica de Madrid) と議論した。彼らのシステムは医療用の CT 画像等を観測機器から直接データベースに取り込み、医者・研究者が web を通じてアクセスするものであった。
- ・ スペインおよびポルガルでは、医療用情報システムは国の主導で開発したものが影響力を持っている。大学等が各自で開発している日本と異なり、画像フォーマットや情報交換プロトコル等が日本ほどバラバラではない印象を受けた。ただし、彼らのシステムは開発コミュニティが大きくなく、国際標準を握るとは考えられない。
- ・ また、NEDO プロジェクトに関連する次の発表があった: **The INFOBIOMED Network of Excellence ; Data Management and Visualization issues in a Fully Digital Echocardiography Laboratory ; A Framework based on Web Services and Grid Technologies for Medical Image Registration ; Service Oriented Architecture for Biomedical Collaborative Research ; Integration of genetic and medical information through a web crawler system**

3. 研究機関訪問

1) Novartis Pharma AG 研究所

- ・ 主力商品の一つであるグリベック (白血病治療薬) は慢性骨髄性白血病 (CML) 患者のフィラデルフィア染色体として知られる転座に由来するタンパク質に特異的に結合する。創薬の過程において、タンパク質に結合する低分子化合物をスクリーニングし、さらに分子設計を行ったこと、また、開発過程において、欧州内では迅速な開発ができないと判断して、アイスランドに工場を建てて大量合成を行ったことは有名である。

- ・同社はゲノム創薬に興味を示す製薬会社であることから、セルアレイあるいはゲノムアレイについて同社の考え方を聞いた。その結果、セルアレイについてはまだ技術開発が途上にあるとの見解であった。これまで主として発現解析およびプロテオーム解析を行ってきたが、ティッシュアレイ及びゲノムアレイによる解析が今後必要となることは理解していた。がん創薬については欧米で頻度の高い前立腺がんおよび乳がんについて興味を持っていた。

2) Helsinki 大、VTT Technical Research Center

- ・ Kallioniemi 教授訪問：教授は4つのEU Grant、3つのフィンランド国Grant、および企業Grantを持ち、さらに今年からフィンランド COE プロジェクトに選出された。
- ・教授の研究室はオリゴアレイによる発現解析とゲノム解析を行っている。フィンランドで多い男性では前立腺がん、女性では乳がんおよび卵巣がんの関連遺伝子に対してオリゴ核酸を設計し、オリゴアレイを製作していた。ただし、(cDNAの必要量が理由で)オリゴアレイの解析には主にごん培養細胞株を用いていた。バイオインフォマティクスに関しては論文検索により発現解析のデータベース作成を行っていた。これまで健常者および患者データ約9000件を入力した。共同核研究施設であるマイクロアレイセンターではアレイ生産および解析依頼を受託していた。

4. CASP7

- ・バイオインフォマティクス手法により、遺伝子の機能予測やネットワーク予測を行う手法は数多く開発されてきたが、近年とくに進展が期待される手法の一つが、タンパク質立体構造予測を経由して、機能の予測やネットワーク推定を行う解析技術である。CASPは世界中の200を超える研究グループが、出題された問題に対して構造予測や機能予測を行い、中立の審査員が各手法の精度を評価する試みである。今回は、夏に行われた評価の最終結果を発表する会であり、本プロジェクトに適用可能な最新技術を調査できた。
- ・1日目は今回新設された機能予測カテゴリでの技術評価が発表された。木原大亮氏 (Purdue 大) の方法が、最良のものの一つとして紹介された。また、タンパク質のドメイン境界予測や、予測品質の予測に関する、新技術も発表された。
- ・2日目は template-based、template-free の2カテゴリでの立体構造予測技術に関するブラインドテスト、および新設の high-accuracy model のカテゴリ評価が紹介された。
- ・3日目は優秀手法に関する発表が行われた。Y. Zhang 氏、韓国 J. Lee 氏および D. Baker グループの活躍が特に目立った。
- ・4日目は応用に関する講演が行われた。CASP で扱われてきたナイーブな計算機構造予測だけでなく、タンパク質の化学修飾による残基間の距離制約情報などを組み合わせる方法、電顕の粗い画像情報と組み合わせる手法など、計測技術とのコラボレーションにより構造予測や機能予測を加速する手法が印象的であった。特に、R. Danblack によるがん遺伝子に関する構造機能予測の発表が、細胞アレイプロジェクトにとって参考となる試みであった。

5. APBC2007

- ・遺伝子発現データの処理法、そこからの情報抽出とネットワーク解析法についての研究の国際的現状を調査した。
- ・1日目はチュートリアルセッションに参加し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現情報からの系統的解析の手法とその問題点について調査した。また、豪ディーキン大の陳伊萍助教授と生体ネットワークとコンピュータ・ネットワークの類似点を比較する観点からのネットワーク解析手法について議論した。
- ・2日目は Evolutionary Tree の Session に参加した。複数の系統樹の類似性比較手法が紹介さ

れ、ネットワーク構造の比較に関するヒントを得た。また、Dr. Stissing の決定論的計算法、Dr. Wang の最尤法の応用、および Dr. Sul による乱数探索が参考になった。

- 3 日目は、米カーネギーメロン大のラグパシー博士による遺伝子のクラスタリングに対する統計検定について、カナダ・オタワ大の Wei XU 博士によるグラフ表現したゲノム・ネットワークの確率分布を推定する解析について最新の手法を知ることができた。また、奈良先端大の高橋弘喜氏と遺伝子発現時系列データの正規化について議論した。
- 4 日目は台湾交通大の黄鎮剛教授と蛋白質の場合と遺伝子の場合のネットワーク解析の共通点と相違点について議論した、また弘前大の種田晃人氏と機能性RNAの構造についての最新手法の議論、および DNA マイクロアレイや細胞アレイでは観測できない現象をどのように考慮すべきかについて議論し知見を得た。

6. 研究機関訪問およびシンポジウム出席

1) Mayo Clinic

- 創薬基盤技術ニーズを中心に調査した。Mayo Clinic は米国最大の臨床治験機関であり、臨床サンプル由来の細胞を用いたターゲット探索および化合物プロファイリング等を行っている。今回は循環器系でハイスループット・トランスフェクションに関心の高い Mukhopadhyay 教授を訪問し、標的探索の現状と TFA のニーズについて情報収集を行った。
- Mayo Clinic はがん患者に最適な治療を施すための技術開発を進めており、その一環として、DNA マイクロアレイを用いて患者の遺伝子発現データを収集し、そこから最適な治療法を選択するための情報抽出を試みている。
- すい臓がんについて Chari 博士から説明を受けた。このグループはすい臓がん患者から採取されるバイオプシ 50 検体/年を予見技術の開発に使っていた。すい臓がん細胞は正常細胞に囲まれており、研究に使うためにはがん細胞の純化が必要であるが、完全純化は難しく、検体からわずかししか回収できない（1 検体で 10⁶ 細胞程度）。従って、少ない細胞数で確実な解析ができる方法、即ち、細胞への遺伝子導入法、データのばらつき、再現性の低下等の解決が課題と考えていた。

2) CHI 4th In vitro molecular imaging, CHI 4th In vivo molecular imaging

- 細胞内分子ネットワークの解析方法について競合技術の情報収集を行った。
- イメージングレポーターの発現に関わる主たる課題
 - a) 標準化：M.Halter ら（米 National Institute of Standard and Technology）は、遺伝的に均一な細胞間でレポーターの発現レベルに 3 桁以上のバラつきがあることについて問題提起を行った。彼らは細胞一個ずつが配置されたマイクロアレイ上で細胞に均一に導入された遺伝子発現レポーターの変動を計測した。その結果、各細胞で発現が大きく異なることが明らかとなった。この結果から、クローンであっても細胞は均一でないという結論が得られた。
 - b) レポーター開発：近年、ナノサイズの粒子に化学修飾を施すことが可能になってきた。その結果、PET、CT 等で検出が可能な機能性粒子（例えば分子レポーターと治療薬を結合したナノ粒子）の開発が行われている。
- レポーターシグナルの解析に関わる課題
 - a) 空間分解能：蛍光タンパク質から発せられる蛍光は、その回折特性が原因で、たとえ一分子計測を行ったとしてもイメージからその位置を単純に割り出すことはできない。この場合、画像処理技術によって分子の位置を特定することが一つの解決法になる（オレゴン大学 J. Remington、ベンチャー企業(Evrogen JSC) V. Belousov)。この研究の共通点は、一分子の光強度がガウス分布であることを利用して、3次元の蛍光強度情報から分子位置を

1 nmの分解能で割り出すものであった。また、磁気を使ったレポーターの発表があった(エール大学 E. Shapiro)。

b) 時間分解能: レポーターの時間分解能についても報告があった(上記 J. Remington)。蛍光たんぱく質に細工を施すことで、ゼロタイムの定義を行なう方法が多数の研究グループで進められており、光刺激によって変化するタンパク質の開発(光活性化蛍光タンパク質、光変換タンパク質、光スイッチングタンパク質など)が紹介された。また、理研・宮脇らが開発した DROMPA 等のレポーターは世界的に注目を浴びていた。

・応用用途の開発に関わる課題

a) 分子間相互作用の解析: 蛍光分子または発光分子と蛍光分子のエネルギー共鳴(FRET、BRET)を利用したレポーター分子が開発されている。FRETは定性的ではあるがイメージングに適し、BRETは定量性が高いがイメージングには適さない。J. K. Westwick(米、ベンチャー企業 Odyssey Thera Inc.)の講演は注目すべきものであり、実際にゲノムワイドにFRET解析を行った結果を報告した。即ち、Nichmickら(モンリオール大)が開発したFRETライブラリー構築技術を用いて、製薬企業と共同で2万種のタンパク質間の分子間相互作用をイメージングできるシステムを構築し、このシステムを用いて化合物のタンパク質間相互作用への影響のハイスループットスクリーニングを行った。

b) 代謝系のモニタリング: 蛍光分子とプロテアーゼ活性中心の共有結合を引き起こすレポーターでプロテアーゼの活性モニタリングを行った例が紹介された(M. Bogyo, Stanford Univ.)。

c) 細胞動態のモニタリング: 長波長レポーターの開発が進み、個体内の細胞をリアルタイムでイメージングする方法が汎用になりつつある。この領域の先進グループのひとつはR. Hoffmanら(UCSD)である。彼らはトランスジェニックマウスの研究を行い、全身GFP発現マウスを開発した。このGFPマウス由来のがん細胞を正常マウスに移植し、腫瘍形成から浸潤転移のリアルタイムモニタリングが行われている。今回はその最前線の研究成果をR. Hoffmanが紹介した。興味深かったのは、ゼブラフィッシュにヒトがん細胞を移植したXenograftモデルについてであった。この方式はAntiCancer Inc. (San Diego)が事業化し、日本の製薬企業も技術導入していた。このモデルは、毒性試験からさらに薬効試験に踏み込んだ解析のスループットの向上につながるものと感じた。

7. 研究機関訪問

1) Max Plank 研究所

- ・ニーズおよび競合技術の調査を行った。既存のハイスループットトランスフェクションシステムを用いたターゲットスクリーニングおよびターゲットバリデーションを行っているDr. Nikolaus Machuyを訪問し、既存のトランスフェクションシステムの問題、トランスフェクションアレイシステムの用途、さらに求められる技術について意見交換を行った。
- ・当該研究グループはヒト呼吸器疾患(喘息など)に関わるウイルスのヒト細胞への感染を助ける遺伝子を探索している。探索にはクリーンルーム内にハイスループットトランスフェクションできる分注ロボットがセットされたシステムを用いて、肺がん由来株化細胞にsiRNAを導入し、ウイルス感染の変化を観察していた。
- ・このシステムは384マルチウエルプレートを用いて60万サンプル/日のトランスフェクションを実行できるが、大量の細胞と試薬が必要であり、ランニングコストが高い課題がある。

2) European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

- ・Dr. Jan Ellenbergらの研究グループを訪問し、競合する技術の調査を行った。

- Dr. Ellenberg は Sabatini (MIT) らが 2001 年に発表したトランスフェクションアレイを遺伝子解析に用いており、その実用化（プロトコール公表、手法の標準化等）を行っている。
- このグループは 2004 年から 2008 年まで欧州 MITO CHECK プロジェクトの枠内でトランスフェクションアレイのシステムを確立してきた。このプロジェクトは英国サンガーセンターと共同でヒト細胞分裂に必要な遺伝子を網羅的に同定することを目的にしたもので、siRNA を細胞に導入した後に起こる細胞分裂異常を一細胞ごとに時系列で観察し、細胞分裂の各段階に係る遺伝子を研究してきた。
- このグループはスライドガラス大のプラスチック製の培養容器にゼラチンに溶かした siRNA をスポットしたものをを用いている（直径約 400 μm の 384 個のゼラチンスポット）。その上に接着した細胞に siRNA がトランスフェクションされる。
- EMBL で実行された解析の概要：運動性が低い HeLa 細胞をモデルとして、有糸分裂の各段階の細胞形態イメージのカタログが作成されていた。形態を分類するソフトも開発されており（精度は約 85%）。細胞集団の時系列画像データから各形態の細胞数の自動分析が出来る。しかし、このソフトはこの細胞株以外への適用は困難とのことであった。
- この調査によって、EMBL のシステムに対し、我々のシステムはいくつか優れた点を持つことが明らかになった：イ) 適用可能な細胞株の範囲、ロ) スポットの定量性、ハ) EMBL が細胞形態の定性的分類にとどまっているのに対し、我々は細胞内の遺伝子ネットワークの推定にまで踏み込んだ解析を行える点。

3) Danone Research

- ニーズ調査を行った。同社は発酵乳産業におけるリーディングカンパニーであり、プロバイオティクスへのトランスフェクションアレイの利用に関心を示したので、Dr. Gerard Denariáz (Director, Probiotics & Microbiology Platform) 等と面談し、当該産業領域への応用について情報収集を行った。
- 同社では 3500 種に及ぶヒト共生菌のゲノム解析、分類、ヒト細胞との相互作用について研究している。プロバイオティクス研究において、バクテリアとヒト細胞の相互作用の解析に強い関心を持っている。国内においても同様のニーズが存在していると考えられる。
- 本プロジェクトは創薬に資する基盤システムの提供を目指しているが、食品産業への波及も期待できると思われた。

8. SCAW

- 単一細胞解析(Single-Cell Analysis)に焦点を絞り、毎年開催されている会合であり、主に次の 4 分野を扱う。
 - a) 設計された微小環境下における、単一細胞の培養および形質決定 (single cell culturing and characterization in designed microenvironments)
 - b) 細胞膜における脂質および膜関連タンパク質／レセプターの動的挙動、および支持されたリン脂質二重膜などのモデル系 (dynamics of lipids and membrane-associated proteins/receptors in cell membranes and model systems such as supported phospholipid bilayers)
 - c) 無標識法を含む細胞および生体膜の高解像度イメージング技法の進展 (advances in high-resolution cell and interface imaging techniques including label free methods)
 - d) 単一細胞アレイの集積化およびシステム上のアッセイ (例、質量分析などの解析技術と結合された微小流路など) (integration of single cell arrays and assays in systems (e.g., microfluidics, combination with analytical techniques such as mass spectrometry))
- Ola Söderberg (Uppsala 大) は先に開発した PLA(Proximity Ligation Assays)の利用について講演した。PLA は特定のタンパク質相互作用を検出するための方法であり、ELISA より高

感度である。PLA は、相互作用を観測したい2つのタンパク質に対して各抗体を準備し、相互作用を2種の抗体間の距離の接近に置きかえて測定する方法である。各抗体に結合したDNA断片が近距離に存在するとき、DNAのligation反応を起こさせると環状DNAが形成される。この環状DNAを増幅させ、2種の抗体間の相互作用の量を、DNAの検出に置き換えて計測するものである。

- Daniel Zenklusen (Albert Einstein 大) は固定化酵母における単一細胞での mRNA の発現量を in situ hybridization で計測した。単一細胞の計測により、MDN1 の例では、burst/non-burst モデルのうち、後者が正しいことを明らかにできた。
- Christoph A. Klein (独 Regensburg 大) は単一細胞レベルで観測することにより、がんの転移に関するマーカーとなるような特殊な状態にある precursor cell の存在を探索した。
- Viola Vogel (ETH Zürich) は細胞外マトリクスにおける力学的な力が細胞に与える構造的・機能的影響について発表した(原子間力顕微鏡で観測)。細胞外マトリクスのフィブロネクチンは、インテグリンを通じて、力を細胞内の細胞骨格に伝えることが分かった。
- Joachim Spatz (マックスプランク研究所) のグループも AFM (原子間力顕微鏡) でインテグリンによる細胞接着力を調べ、細胞接着の時系列的モデルとの関係を論じた。
- Michael Smith (前述 Viola グループ) は、血流方向に細胞が細長くなるなど、外力を受けた細胞の立体形状と、それを引き起こす内部機構について興味を持ち、Microwell (微細加工による溝) に単一細胞をはめ込んで培養することにより、細胞への影響を記録した。
- 小澤岳昌 (東京大学) は分割されたレポーターが近接することによる再構築で蛍光または発光するというメカニズムに基づくいくつかの手法を紹介した。Luciferase にループを人工的に挿入し、Caspase-3 が活動していればタンパク質のスプライシングが起きてループが除去されて蛍光が復活する、との手法を使って、Caspase-3 生体マウスにおける活動を光として確認した。
- 総評として、単一細胞の計測については、光学的、力学的、化学的、電気的など様々な手法が揃いつつあり、以前より議論が活発になった印象であった。

9. CHI, Discovery on Target

- siRNA を用いた標的特定技術の動向を調査した。この会は国際的製薬企業、欧米有数のアカデミア、バイオベンチャーが集まるため、多角的な情報を収集できる。Imaging technology for target discovery、Screening for potential drug targets、RNAi for screening および RNAi for therapeutics の4セッションに参加した。

• イメージング技術トピックス

1) 液晶フィルターを用いた分光技術と多色染色 (CRI, Inc.) : 多色染色では色素にスペクトルの幅があるため、通常のバンドパスフィルターでは複数の色素に由来する光を同時にとらえてしまい、標的を的確にとらえることが難しい。この問題を解決するために、液晶フィルターを開発し、550nm から 650nm までの波長を連続的に変化させることを可能にした。その結果、複数の染色剤ごとにイメージを算出することができた。応用として、T細胞とB細胞について細胞分裂マーカーで多重染色した例、およびがんマーカーの多重染色の例が紹介された。

2) 生細胞での RNA のイメージング (N. E. Broude, ボストン大) : タンパク質に比べ、ターンオーバー数の大きい RNA のイメージングは困難であった。従来は、直接のイメージング法がなく、蛍光タンパク質の発現を観察するなどの間接的な方法がとられていた。Broude らは標的遺伝子の RNA にアプタマー (リガンドを特異的に結合する高次構造を持つ RNA) を連結させる手法をつかって生細胞中で生成・分解される RNA のイメージングを開発した。

・ RNAi を用いたターゲットスクリーニングに関するトピックス（企業を中心に）

1) ABBOTT の報告: 化学修飾によってオフターゲットを低減させた siRNA (OTP siRNA) ライブラリーの設計とターゲットスクリーニングにおけるその効果について紹介があった。オフターゲットを低減させたライブラリーは、キナーゼ標的が 788 種、GPCR が 580 種、ドラッグブル遺伝子標的が 6042 種であった。従来はキナーゼでは初期スクリーニングのヒット率は 10%、2 次スクリーニングによる絞り込みで 1% であったが、OTPsiRNA を用いることによって初期ヒット率が 3.4%、2 次は 25% に改善された。

2) Novartis の報告: TRAIL パスウェイをモデルとして、siRNA スクリーニングを化合物プロファイリングに応用する事例の報告があった。TRAIL を介する細胞死は Caspase3 等を経由するアポトーシスによるものであり、このパスウェイでは XIAP と SMAC ペプチドの関与により Caspase3 が抑制されている。彼らは SMAC ペプチドと構造類似化合物を開発中である。また、がん細胞の中にはこの化合物に高感受性のものがあることが判ったので、siRNA を用いてその機構を検討した。その結果、この化合物は TNF α を誘導し、細胞死に導くことが明らかとなった。

3) T-Gen の報告: 薬剤のセンシタイザーの合理的探索の例が 2 つ紹介された。一つ目は Lapatinib (EGFR 等を標的とする抗がん剤)。siRNA ライブラリーを導入した細胞パネルに薬剤を添加し、細胞死を増大する標的を絞り込んだ。その結果、MAP パスウェイ等が薬剤感受性を増すことが明らかとなった。これらのパスウェイを標的にした薬剤は多数上市されており、今後、これらの既存薬剤のコンビネーションを検討するとのことであった。二つ目は Gemcitabine の感受性を増大させる標的の探索であった。

4) オーバービュー: 参加企業の問題意識はターゲットスクリーニングにおけるオフターゲット問題をどのように解決するか、ということであった。パスウェイ解析においては、ヒットした遺伝子をテキスト情報によって構築されたパスウェイ上にマップし、どのパスウェイ上の遺伝子が多いかで、大まかなパスウェイを見定める方法が受け入れられていた。

・ アカデミアでの取り組み

1) J. Mackeigan (Van Andel Research Institute): 薬剤 (Taxol, Etoposide, Cisplatin) の感受性を増大させる siRNA のスクリーニングに取り組んでいた。例えば、キナーゼ等を標的にしたライブラリーから Taxol 感受性を増大させる標的を明らかにし、この遺伝子をノックダウンしてミトコンドリアの融合現象を観察した。

2) M. A. White (テキサス南西大): ここでも Taxol 感受性を増大させる標的の探索が報告された。興味深い点は、米国では大学でもゲノムワイドスクリーニングを行うケースが増えており、Taxol 感受性をモデルにしたケースが多くみられるが、結果が皆異なることである。

3) N. Perrimon (ハーバード大): 個体と細胞レベルの機能相関が得られる Drosophila モデルを使って、JNK/ERK パスウェイについて、siRNA ライブラリーから機能的にスクリーニングした分子群とマススペクトロメトリーを応用して構造的な関係から得られた分子群の関係について報告があった。両者のオーバーラップは 315 個 (約 40%) であった。

・ RNAi セラピーのトピックス

1) RXi Therapeutics: RNA 医薬には血中滞留時間と膜透過の課題があったが、RXi は従来の RNA に比べ投与量が 100 分の 1 ですむ新しい siRNA を開発した。

2) J&J: siRNA 医薬用 DDS の紹介があった。

3) Quark: RNAi 医薬の先進企業 (ベンチャー企業) の一つ。化学修飾を施したブラントエンド二本鎖 RNA の点眼薬を開発中であった。

4) Cequent Pharmaceuticals: 非病原性バクテリアを使った shRNA デリバリーシステムを開発中である。そのバクテリアは細胞壁表面に Invasin が発現しており、動物細胞に取り

込まれ易い。このシステムの効果と安全性が確認されれば、競争力のある医薬品になる可能性がある。

10. 研究機関訪問および Meeting 出席

1) Genentech 社

- Transfection Micro Array を含むセルアレイのシステムを使った研究を一時期行っていたが、基礎研究に留まり、創薬開発プロセスへの実用化は行っていなかった。HTS (High Throughput Screening) において siRNA を使用することはまれのようであり、彼らは、siRNA による遺伝子の機能解析を行っても、実際の効能や毒性を正確に予想することは不可能だと割り切っていた。化合物スクリーニングにはウェルベースの HTS を用いていた。これは、現在のセルアレイでは、スポットごとに薬剤を変える技術がないためであるとのことであった (正確には、基盤技術が PNAS に公表済)。薬剤スクリーニングを集積化するための基礎技術開発は現在米国でも頓挫しているようである。

2) ASCB 48th Annual Meeting (アメリカ細胞生物学会)

- NIH Roadmap Molecular Libraries Program について：分子ライブラリープログラム (The Molecular Libraries Program [MLP]) は高品質なプローブの作製、高付加価値を持つターゲットの生化学的なデータ収集を促進する事を目的としている。Molecular Libraries Probe Production centers Network (MLPCN) は相補的な役割を持ち、様々なアッセイやケミカルプローブの開発を可能にするため、「酵素、プロテアーゼ、GPCR、イオンチャネルトランスポーター、タンパク質相互作用、タンパク質のミスフォールディングと分解、NMR ベースの手法、ハイスループットフローサイトメトリー、ハイコンテントアナリシス、ハイスループット顕微鏡技術、BSL-3、タンパク質キナーゼなど」の分野をサポートしている。
- 総括：米国では、siRNA を用いた遺伝子のスクリーニングにより創薬ターゲットを同定するというアプローチではなく、化合物そのものを直接スクリーニングするというアプローチを指向している。そのためには、より高速な HTS 技術とプローブ、ライブラリーの整備が必要となる。これらのインフラを整備するため、NIH が主導し、米国の研究者が共同でアクセスできるようなプローブ、化合物ライブラリー、データベース (PubChem) の構築を目指している。

3) The Scripps Research Institute

- ハイスループットスクリーニングの必要性について議論した。米でもレトロウイルス等を用いたチップ作製には抵抗があり、ウイルスをアレイ化したチップの実験室外への移動あるいは販売は困難である。また、産総研やサバティエニグループが開発したタイプのセルアレイ (トランスフェクションアレイ) は初代培養細胞、幹細胞、iPS 細胞等への遺伝子導入が困難な場合も多い。従って、彼らはエレクトロポレーションベースのアレイ作製を試みているとのことであった。遺伝子の核移行を考えた場合、エレクトロポレーションでは核膜にも孔が開くため、遺伝子は一気に核まで移行すると期待できる。未発表であるが、基盤は確立しているようであるが、遺伝子の拡散の問題が解決していないとの事であった。使用する試薬は我々と似ており、ゼラチン、フィブロネクチン、ポリ L リジンであった。

4) Burnham Institute for Medical Research

- Prof. S. Chanda は HTS を用いた遺伝子バリデーション、シグナル経路解析を行っており、TRAIL によるアポトーシスに関連する遺伝子のスクリーニングをモデルとして、新たな統計学的手法を提示している。そこで、HTS の現状と精度の問題について意見交換した。彼

によると、Sabatini (ハーバード大) はすでにアレイ研究から撤退したとのことであった。その理由は、既存のウェルベースの方法が薬剤添加などに応用ができ、この場合は既存の機器が使えること、また、様々なアッセイ法が研究しつくされていること、集積度もチップに迫るほどに上がってきた、などである。HTS を行う際のウェルとチップに共通の問題は実験精度であり、その対応としてはセカンドスクリーニングが重要 (HTS は一次の大まかな絞込の手段) であるとの認識であった。しかし、その精度を上げることの重要性は認識していた。

1 1. EMBO meeting 出席および研究機関訪問

1) EMBO meeting

- EMBO ミーティングは分子生物学全般のセッションが設けられている。今回は、トランスフェクションアレイ技術全般、及び一細胞時系列解析技術のニーズ調査を目的とした。
- 微小管制御の原理のセッションでは、Steinmetz M. O.により微小管制御タンパク質の微小管認識ドメインと細胞分裂、細胞運動、細胞内輸送との関連に関する発表があった。
- 染色体のダイナミクス、維持、進化のセッションでは、バクテリアの染色体のダイナミクスにおける DNA トランスロカーゼの役割 (Sherratt, D.)、テロメアがどのようにして染色体末端をプロテクトしているか (Lange, T. D.) 等の発表があった。また、West, S.は DNA 修復のプロセスと疾患の関連 (乳がん抑制遺伝子 BRCA2 を核に再局在させると Double strand break の修復が活性化するが、BRCA2 が働かないと染色体が不安定になる) について報告した。この発表は NEDO プロジェクトにおいて研究を進めている UV による皮膚ダメージ修復遺伝子の参考となった。
- 細胞死のセッションでは、T リンパ球において、NFkB パスウェイの阻害によって誘導される細胞死はカスパーゼや Fas, TRAIL などのデスレセプターによる細胞死とは独立したものであることが報告された (Krammer, P. H.)。また、がんの浸潤、転移は、カテプシンなどのリソソームのプロテアーゼの発現変化等により生じるが、サイトゾルへのカテプシンの放出等によって、誘導される細胞死のパスウェイを起こしやすくするようながん治療のアプローチが考えられる。Jaatela, M.らは、siRNA によるノックダウン解析によりキノームのスクリーニングを行い、リソソームを活性化する ErbB2 を発見した。この発表は、産総研で行っている細胞運動アレイによるキノームスクリーニングに役立つ情報であった。
- TOR シグナルのセッションでは、TOR と aging、発生および細胞増殖の制御との関連が発表された (Hall, M. N.)。また、TOR は組織や細胞の大きさをコントロールしている事が分かってきた。この原理が女王蜂に分化する機構とも関与している。
- 発生とがんに関わるシグナルパスウェイのセッションでは、Ras の分子スイッチとしての役割について発表があった。Ras のパスウェイはがんのターゲットとして適している。
- 再生医療、幹細胞のセッションでは、山中先生の iPS 細胞についての発表があった。

2) Wageningen University (Agrotechnology & Food Sciences)

- Dr. Colin Ingham (Laboratory of Microbiology, Bacterial Genetics) および齋藤勝一氏 (微生物用の細胞アレイ開発) と情報交換を行った。彼らは微生物の細胞チップ化を行っていた。彼らのバイオチップはバクテリアの分野でも応用されており、細胞の増殖を検出する酵素ベースのスクリーニング系を構築していた。20 μ m x 20 μ m で区切り、10000 のコロニーから 1 コロニーを区別する事が可能なチップであった。E. coli, C. albicans, L. plantarum などの増殖の評価ができ、化合物が増殖に与える影響をハイスループットにスクリーニングできた。

5-2 委員会等の開催

研究推進委員会（実施者委員、外部委員、経済産業省、NEDO 技術開発機構が出席）、研究推進委員会・小委員会およびプロジェクト推進会議（実施者のみ出席）の開催、さらにワークショップ開催およびバイオジャパン NEDO ブース出展を行い事業の推進を図った。

尚、平成 19 年度までは本プロジェクトにアステラス製薬（株）、エーザイ（株）および岡山大学が参加しており、研究推進委員会は共同で開催した。

5-2-1 研究推進委員会の開催

第 1 回（H17.10.14）、第 2 回（H18.2.9）、第 3 回（H18.8.8）、第 4 回（H19.2.8）
第 5 回（H19.12.12）、第 6 回（H20.9.8）、第 7 回（H21.2.4）、第 8 回（H21.8.4）
第 9 回（H22.2.20）

5-2-2 プロジェクト推進会議の開催

第 1 回（H17.11.8）、第 2 回（H17.11.30）、第 3 回（H17.12.21）、第 4 回（H18.1.23）
第 5 回（H18.5.16）、第 6 回（H18.7.28）、第 7 回（H18.12.12）、第 8 回（H19.1.25）
第 9 回（H19.10.19）、第 10 回（H20.4.24）、第 11 回（H20.7.28）、第 12 回（H21.1.20）
第 13 回（H21.7.17）

5-2-3 研究推進委員会 小委員会（検討会）の開催

第 1 回（H21.9.18）、第 2 回（H21.12.1）、第 3 回（H22.2.13）

5-2-4 その他の運営管理

1) ワークショップ開催：2007 年 5 月 31 日（13:30～18:40）、サンケイプラザ(東京)において本プロジェクトに関するワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术ー遺伝子の森から創薬を見るー」を開催した。本ワークショップにおける講演および議論を通して、本プロジェクトの推進に有用な知見および意見を得ることが出来た。また、成果の発表により技術の PR を行うことが出来た。

2) バイオジャパン NEDO ブース出展：平成 18 年 9 月（大阪）および平成 21 年 12 月（横浜）に開催されたバイオジャパン(主催:バイオジャパン組織委員会(バイオインダストリー協会他)、日経 BP 社)における NEDO ブースにプロジェクト成果を展示した。

5-3 集中研における共用システムの構築およびその運用実績

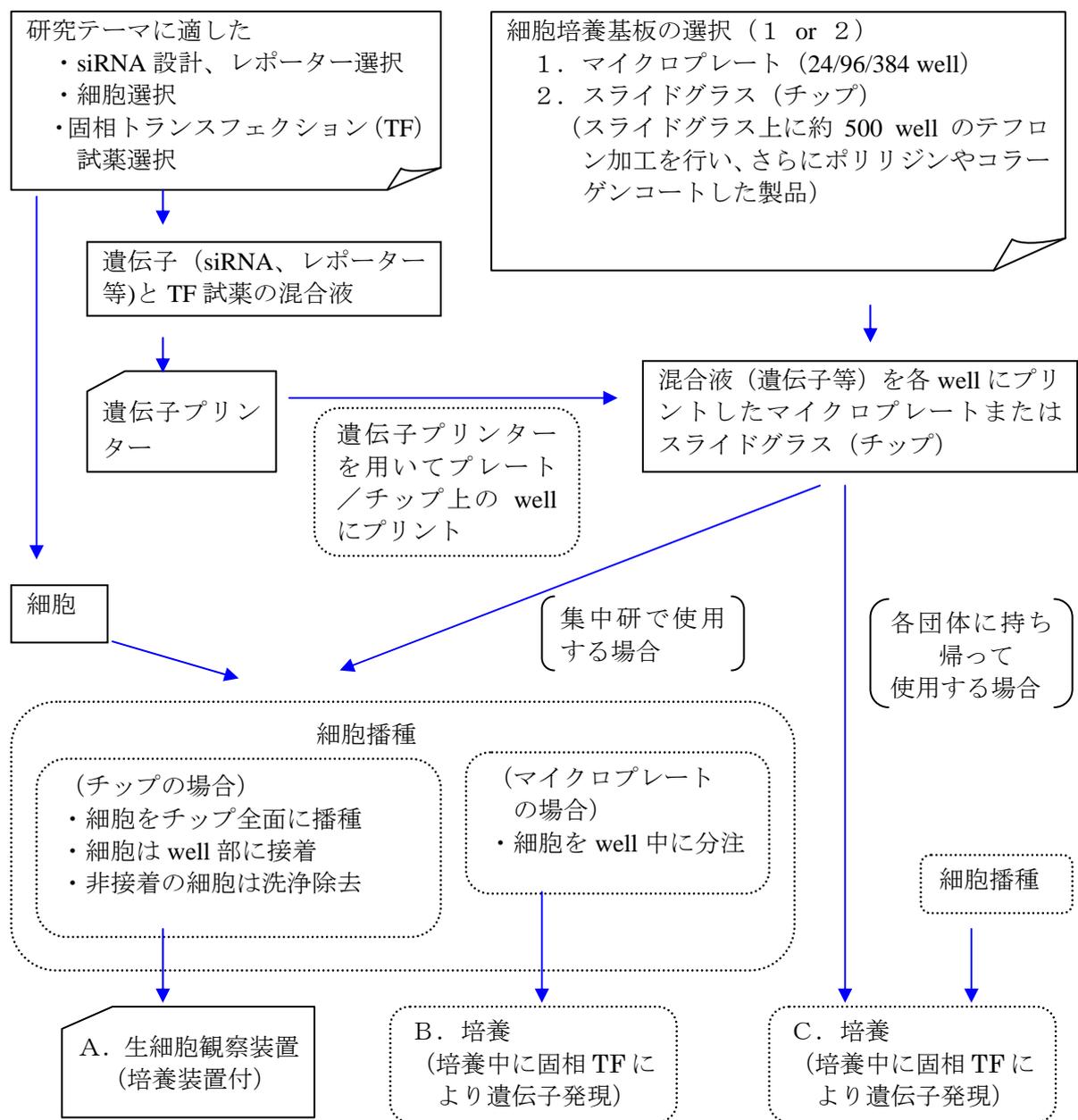
バイオインダストリー協会（JBA）は産業技術総合研究所（産総研）セルエンジニアリング研究部門（RICE）（臨海副都心センター本館）内に設置した集中研（JBA 分室）に解析用の共用システムを構築し、本事業に参加した団体および研究者の用に供した。また、JBA は共用システムの管理および運用（実験と解析支援等）を担当した。尚、これらの管理および運用は産総研 RICE の研究者の指導と協力を得て行ったものである。

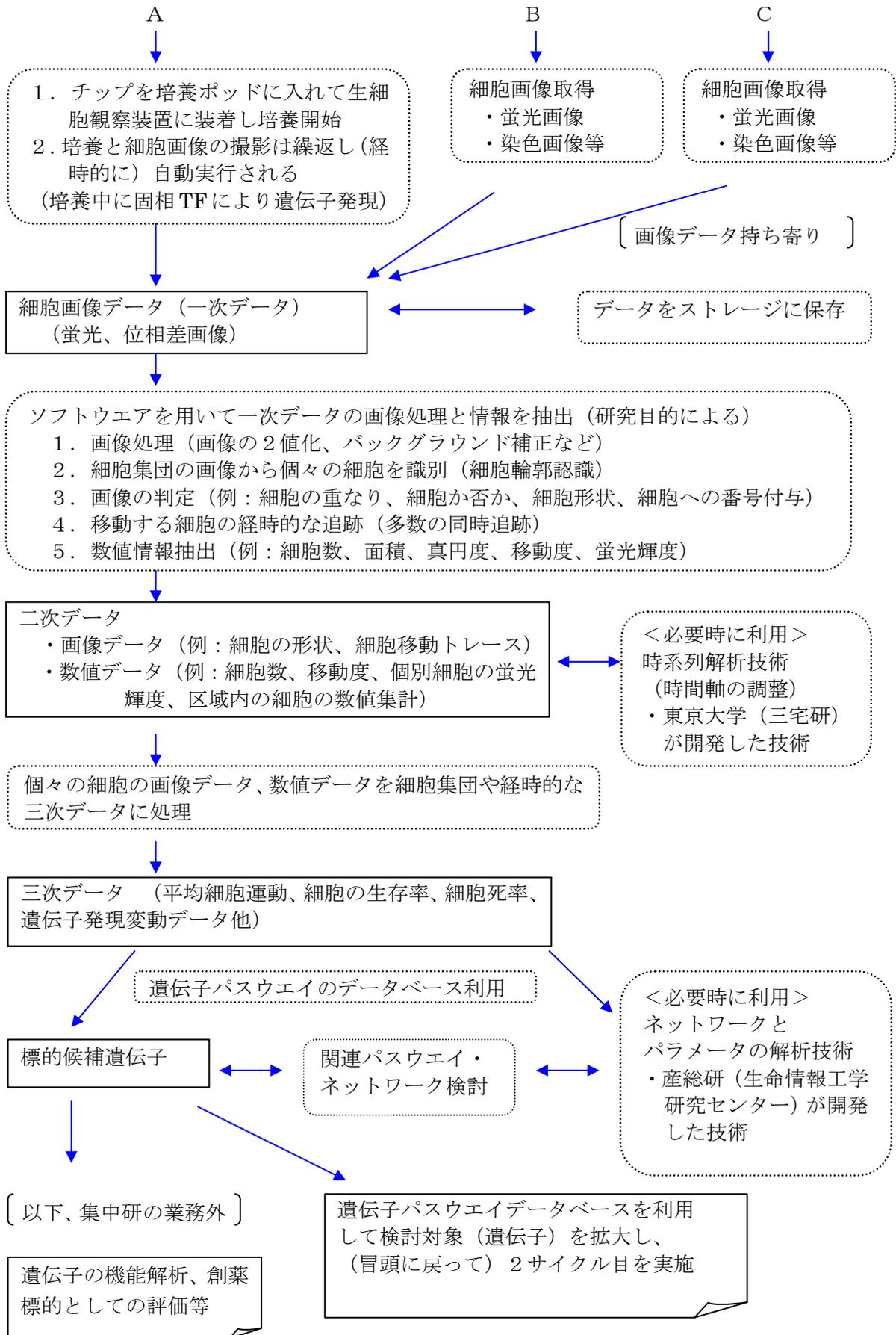
以下、共用システムの概要および運用実績を示す。

5-3-1 共用システムの概要

5-3-1-1 システムの構成および研究（作業）の流れ

集中研は、参加団体が用いる固相トランスフェクション（TF）用の細胞培養基板（マイクロプレート、スライドグラス（チップ））の作成を担当した。また、生細胞観察装置を用いる細胞画像の取得および画像データの解析について分担または支援を行った。





5-3-1-2 機器とソフトウェア

集中研の作業において主要な役割を果たした機器とソフトウェアの概要を示す。

1) 生細胞観察装置

産業技術総合研究所とオリンパス（株）が共同開発した特注品である。

マイクロプレートおよびスライドガラス（セルアレイ）上の生細胞の変化を経時的に観察する目的で開発されたものであり、細胞を培養しながら、蛍光画像と位相差画像を経時的に（間歇的に）自動取得することができる。

<構成>

- ・細胞培養ユニット、
- ・顕微鏡および撮像ユニット（CCDカメラ、XYステージ）
- ・計測ソフトウェア

<機能>

- ・セルアレイ上の細胞を連続的に培養できる機能
- ・遺伝子導入した細胞の形態と蛍光の発現状態を経時（間歇）的に（蛍光、位相差）観察する機能
- ・セルアレイの配置に合わせて動作制御する機能（XY軸制御、自動焦点）



<主な仕様>

- ・XYステージの分解能（培養チャンバーの移動精度）：5 μ m以下
- ・培養ユニットの制御範囲：培養温度 30~38 $^{\circ}$ C、培養炭酸ガス 3~7%
- ・培養液供給量の調整範囲：5~10mL/sec
- ・培養チャンバー（XYステージ上に搭載）の温度精度 $\pm 0.5^{\circ}$ C

<動作性能>

- ・1スライドガラス（チップ）上の例えば200well（スポット）を60分間隔で撮像する場合、1スポットにつき18秒でx軸とy軸方向の移動と焦点調整（z軸）を行う。これを数日間継続できる。
- ・1well（スポット）中の例えば数十個の細胞の画像を取得し、解析に供する。

2) 遺伝子プリンター（マイクロアレイ用スポットティング装置）（インクジェット式）

産業技術総合研究所とクボタコンプス（株）が共同開発した市販品である。

当初はプリントノズル数（最大）8本の大型機種（KCS-1）を用いたが、後にはプリントノズル数1本の小型機種（KCS-mini）も用いた。

イ) マイクロアレイプリンター KCS-1

スライドガラスを基板としたチップ作成に対応しており、異なった数種類の試薬を同じ位置に重ねて、非接触でプリントできる（多重プリント）。CCDカメラにより、プリントヘッド（プリント位置）は自動補正される。

<主な仕様>

- ・プリントノズル数：最大8本
- ・プリント能力：2.5プリント/sec
- ・プリント数：最大1512プリント/スライドガラス
- ・作成スライド数：20枚/ユニット



ロ) マイクロアレイプリンター KCS-mini（コンパクトな卓上機種）

スライドガラスおよびマイクロプレートに対応しており、異なった数種類の試薬を同じ位置に重ねて、非接触でプリントできる（多重プリント）。CCD カメラにより、プリントヘッド（プリント位置）は自動補正される。

<主な仕様>

- ・プリントノズル数：1本
- ・同時プリント数：スライドガラス8枚、カルチャウエルプレート2枚
- ・プリント量：10～25nl（試薬プレート 96/384 ウエルプレート）
- ・プリント精度：CV 値 20%以内



3) 細胞培養セル

イ) マイクロプレート（市販品）

ロ) スライドガラス（チップ）

産業技術総合研究所と松浪硝子工業（株）が共同開発した、スライドガラス上に 570 well (15×38) のテフロン加工を行い、さらにポリリジンコートおよびコラーゲンコートを行った特注品を用いた。通常は内側の 432～468 well を用いる。

尚、実験目的により、加工しない（well のない）スライドガラスも用いる。



well 直径 0.325mm

4) 細胞画像の解析および数値化ソフトウェア

次の4種のソフトウェアを目的に応じて使用した。

- ①産業技術総合研究所（生命情報工学研究センター）が開発したソフトウェア（特長：蛍光を発する細胞のトレースに適する）
- ②上記の細胞観察装置（オリンパス（株））付属のソフトウェア（特長：同上）
- ③東京大学が購入した細胞観察装置（横河電機（株））付属のソフトウェア（特長：上記に加え、細胞運動評価セルアレイに適する）
- ④独 Definiens 社のソフトウェア「Definiens eCognition Server」（特長：細胞組織画像の分析に適する）

ソフトウェアに必要とされる機能は研究内容により異なるが、全般的には次のものが期待される。

- ・細胞集団（例えば数十個）の画像から個々の細胞を識別する機能
- ・データとする画像の判定（細胞の重なり、細胞か否かの判定）、細胞形状の分類および細胞への番号付与を行う機能
- ・移動する細胞を経時的に追跡する機能（多数の同時追跡）
- ・上記の細胞画像から数値情報（細胞数、面積、真円度、移動度、蛍光輝度等）を抽出する機能

5) 遺伝子パスウェイのデータベース

次の2種の市販品を用いた。

- ・MetaCore データベース（GeneGo 社）（ヒト疾患、代謝パスウェイデータベース）
- ・KeyMolnet（医薬分子設計研究所）

5-3-2 共用システムの運用実績

4テーマについて実施した作業（2種）について作業量をまとめた。

<ul style="list-style-type: none"> ・ 4テーマ <ul style="list-style-type: none"> ①TRAIL パスウェイ関連（産業技術総合研究所 RICE） ②細胞運動性関連（産業技術総合研究所 RICE） ③パクリタキセル感受性関連（癌研究会） ④ヒト由来細胞の UV 感受性関連（カネボウ化粧品） ・ 作業 <ul style="list-style-type: none"> ①固相トランスフェクション用のチップ（スライドグラス）およびマイクロプレート（96穴プレート）作成 ②生細胞観察装置を利用した画像データ取得と解析

1) 固相トランスフェクション用チップ（スライド）の作成件数

テーマ	供試した遺伝子数 (重複あり)	チップ1枚のスポット数 (チップ作成枚数)	スポット (プリント)総数
TRAIL パスウェイ 関連	約 829	432 (172 枚)	約 7.4 万
細胞運動性関連	約 742	52 (640 枚)	約 3.3 万
パクリタキセル感 受性関連	約 1191	288～480 (118 枚)	約 4.5 万
ヒト由来細胞の UV 感受性関連	約 718	288～480 (182 枚)	約 7.9 万

計 約 23 万

2) 固相トランスフェクション用マイクロプレート（96穴プレート）の作成件数

テーマ	供試した遺伝子数 (重複あり)	96穴プレートの 枚数	スポット (プリント)総数
パクリタキセル感 受性関連	約 434	352 枚	約 3.3 万
ヒト由来細胞の UV 感受性関連	約 704	315 枚	約 3.0 万

計 約 6 万

3) 作成したチップおよび96穴プレートを用いた試験の実施分担

①「TRAIL パスウェイ関連」および「細胞運動性関連」

作成したチップは集中研において、（生細胞観察装置を用いて）培養、細胞画像取得および解析を行った。

②「パクリタキセル感受性関連」

作成したチップおよび96穴プレートの多くは、自団体において培養および細胞画像取得（またはアッセイ）を行った（一部は集中研で実施）。

③「ヒト由来細胞の UV 感受性関連」

作成したチップは、自団体に持ち帰って培養と処理（UV 処理等）を行った。その後、チップを集中研に移動し、細胞画像取得と解析を行った。96 穴プレートを用いた試験は集中研で行った。

4) 取得した細胞画像の合計数

集中研で実施したプリント（スポット）数の合計は約 29 万となる。各スポットの撮影回数（経時的な測定回数）は実験により異なるが、例えば、60 分間隔 100 時間の実験の場合、1 スポットで 100 画像が得られる。

従って、集中研で取得・保存・解析した画像の合計数は 500 万に達すると思われる。

特許、論文、外部発表等の件数

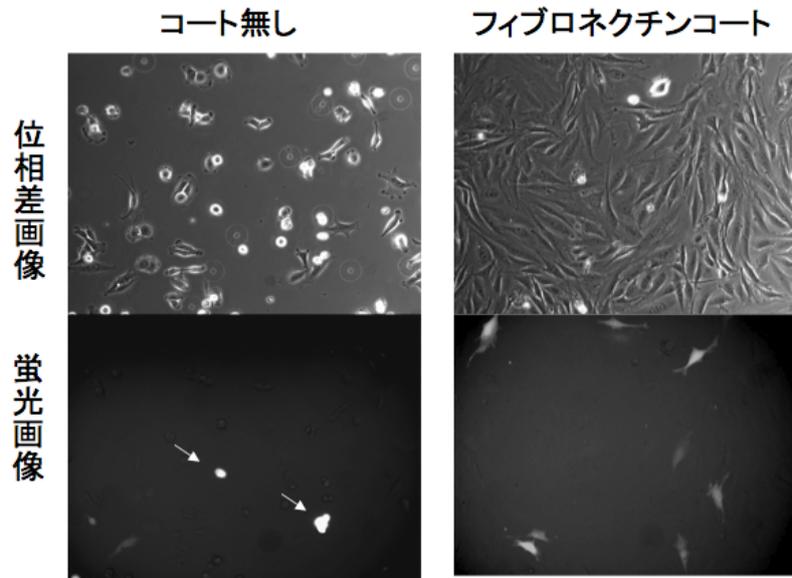
区分 年度	特許出願			論文、発表等		その他外部 発表（プレ ス発表等）
	国内	外国	PCT 出願	論文等	学会発表 講演	
H17～21FY	1 件	1 件	1 件	193 件	268 件	2 件

内訳

実施団体	特許	論文 総説	学会発表 講演	受賞	その他 発表
産総研 RICE（臨海）	2	23	61	2	
産総研 CBRC	1	40	24		
産総研 RICE（つくば、レ ヌー氏 Gr）		16	36		
癌研究会、協和発酵キリン		16	22		
カネボウ化粧品		2	7		2
東京大学 三宅研	(1)	40	41	1	
東京大学 長棟研、鷺津研		14	32		
京都大学		17	13		
山口大学、産総研 RICE（つ くば、平野氏 Gr）		25	28		
バイオインダストリー協会			4		
合計	3	193	268	3	2

注：各団体間に重複あり。

図表
(第2章 2-2)



フィブロネクチンコートにより細胞の形状は扁平化し、レポーターの発現強度が増大している。コート無しに見られる強い光は細胞の球状化による蛍光蛋白質密度の増大による(白矢印)

図 2(2)-1 培養基材表面へのフィブロネクチン塗布による NIH3T3/Venus 細胞の形態変化

AP1-d2EGFP レポーター遺伝子の構造模式図

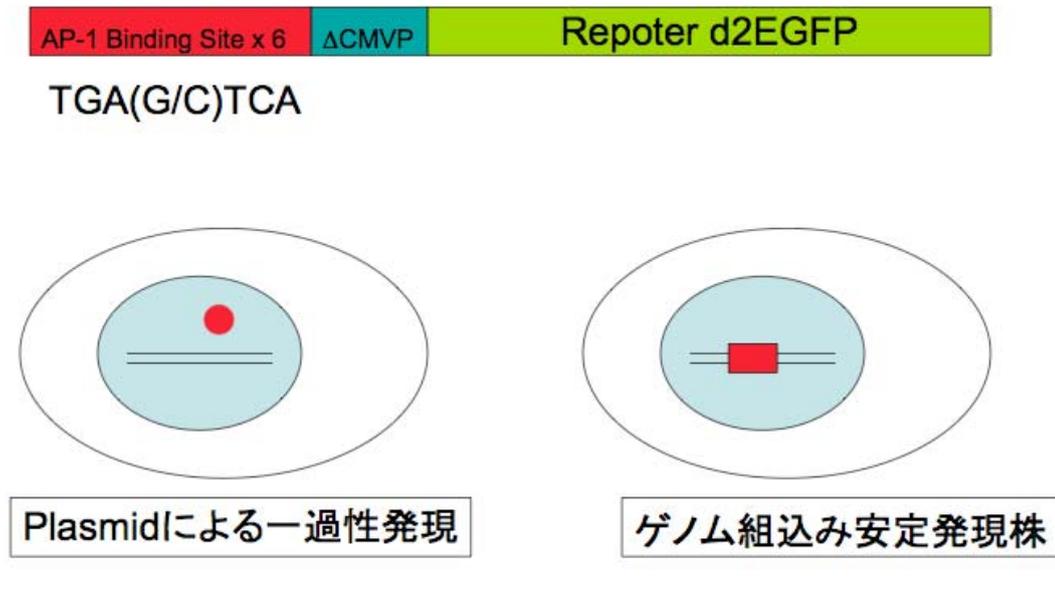
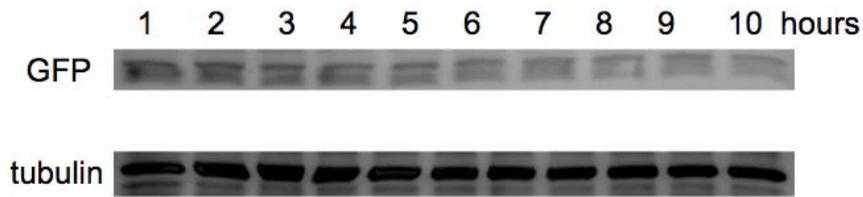
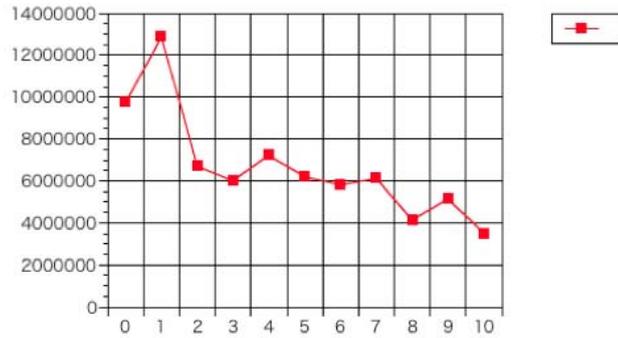


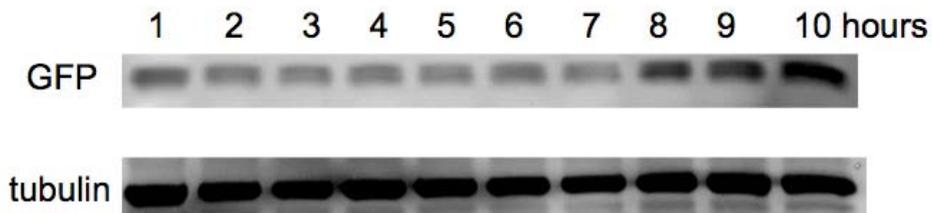
図 2(2)-2 transcrittion cis-element repotor 模式図



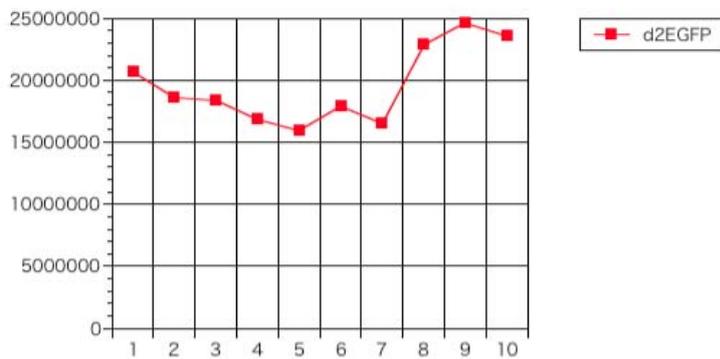
Transient Expression by Plasmid



プラスミド DNA 導入に依る一過性発現系では TRAIL 刺激によるレポーターの誘導は見られない。



Stable Transfectant



安定発現株の場合、TRAIL 刺激後 8 時間以降からレポーター蛋白質 EGFP の増大が見られる。

図 2(2)-3 レポーターコンストラクト組み込み法の違いによる対刺激応答性の比較：ウエスタンブロットによる生化学的解析

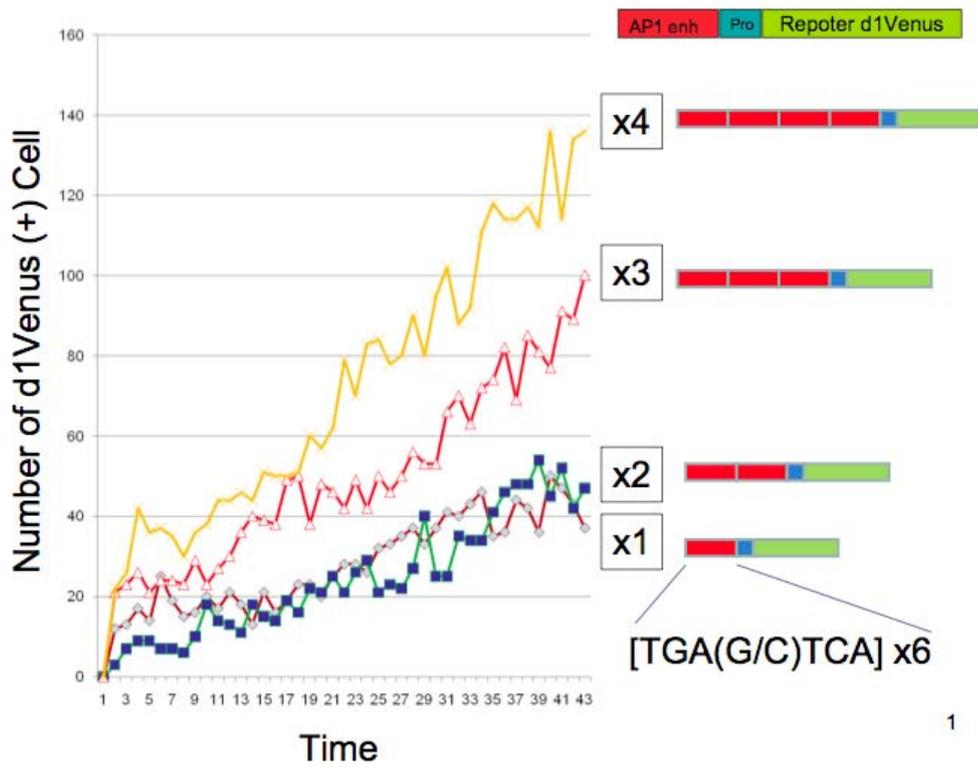


図 2(2)-4 多重連結 AP1 エンハンサーによる AP1-d1Venus レポーター応答性の改善 (NIH3T3)

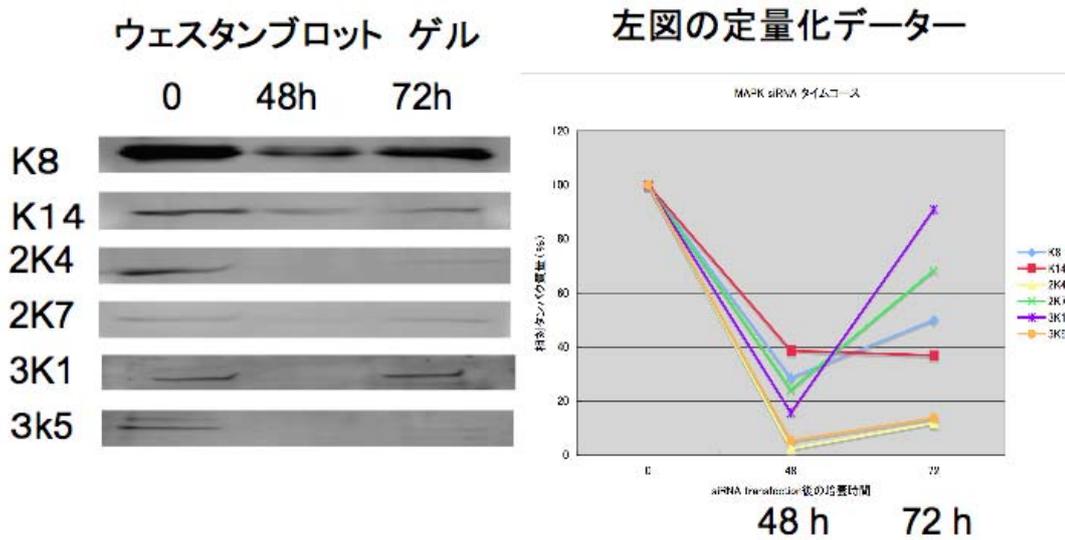
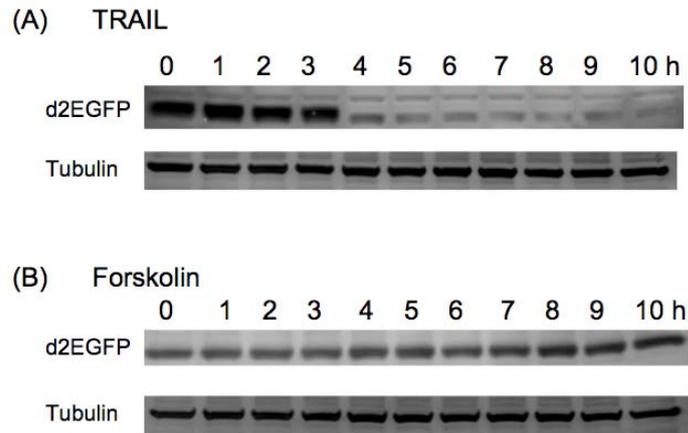
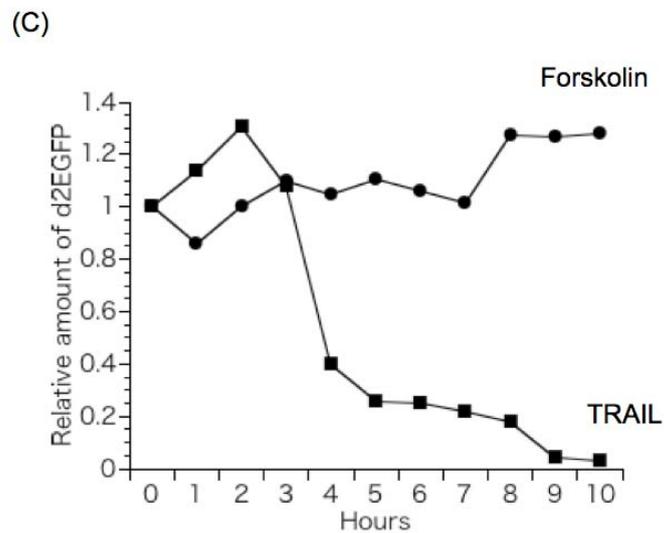


図 2(2)-5 siRNA による MAPK 発現抑制



レポーターコンストラクト CRE-d2EGFP を導入したモデル細胞 NIH3T3 に TRAIL 刺激を与えた所、レポーター蛋白質 d2EGFP の発現抑制が観察された。(A) TRAIL 刺激後のウエスタンブロット、(B) 転写因子 CREB を活性化し、レポーター蛋白質の発現増大を起こす事が分かっている Forskolin を与えた対照実験群のウエスタンブロット。Tubulin 蛋白質の量をインターナルコントロールとした。



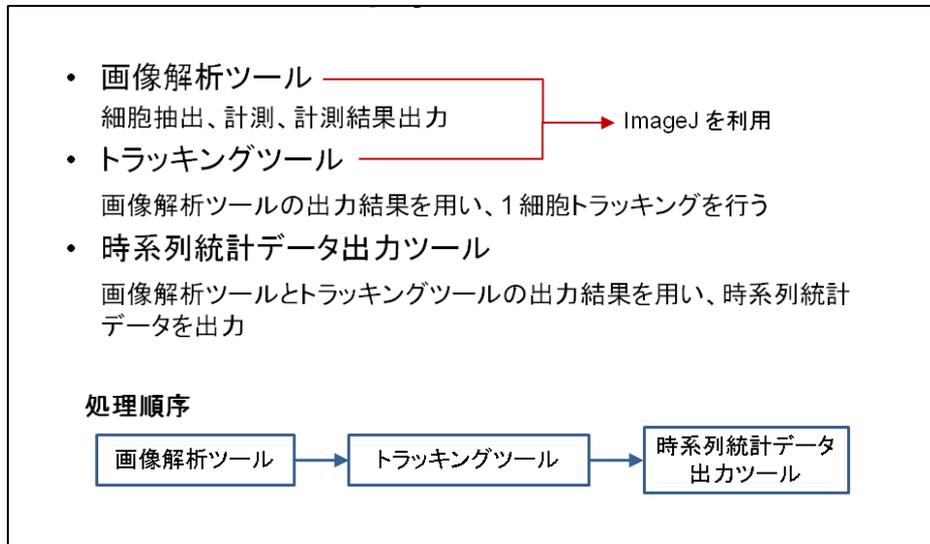
上のウエスタンブロットのバンドを定量化し、タイム 0 のバンドの強度を 1.0 として、相対値を取ってグラフ化した。TRAIL 刺激によってレポーター蛋白質 d2EGFP の量が、9 時間後には 10%以下になっている事が分かる。

図 2(2)-6 TRAIL による転写因子 CREB 活性のダウンレギュレーション

(第2章 2-3)

図 2(3)-1 (A~J) 時間遅れを示す微蛍光細胞画像数値化のアルゴリズム

2(3)-1 A 画像解析ツール



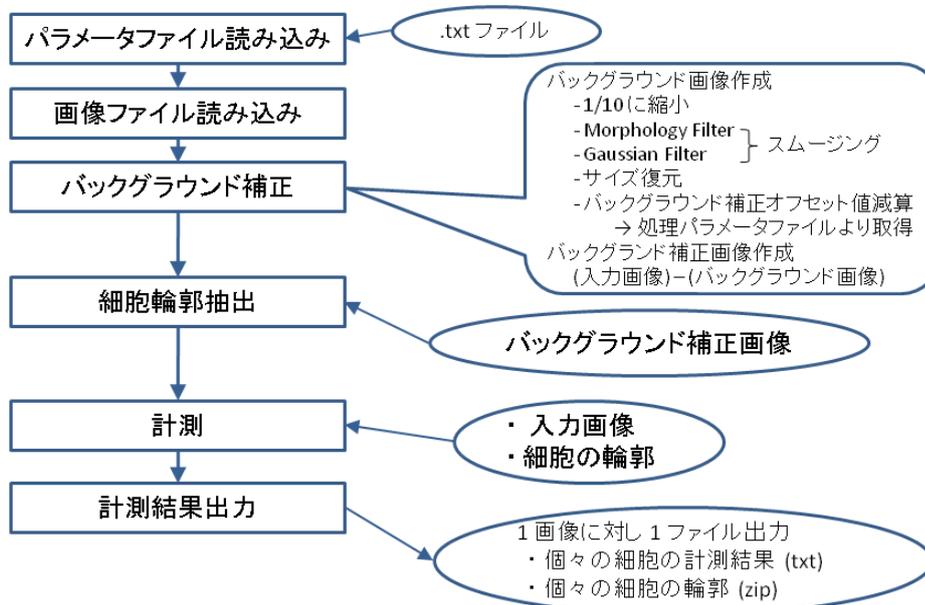
2(3)-1 B Image J

ImageJ

- NIH (National Institutes of Health, USA) が開発したオープンソースでパブリックドメインの画像処理ソフトウェア
- Java で開発 → マルチプラットフォーム対応
- Java プラグインやマクロによる機能拡張が可能

URL : <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>
Author : Wayne Rasband (wayne@codon.nih.gov)
Research Services Branch, National Institute of Mental Health,
Bethesda, Maryland, USA.

画像解析ツール



処理パラメータファイル

```

analyze_image_type=G:Y

background_offset=100.0
background_morph_radius=2.0
background_smooth_radius=5.0
background_scaling=0.1

min_particle_size=1000
max_particle_size=15000
exclude_edge_particles=true

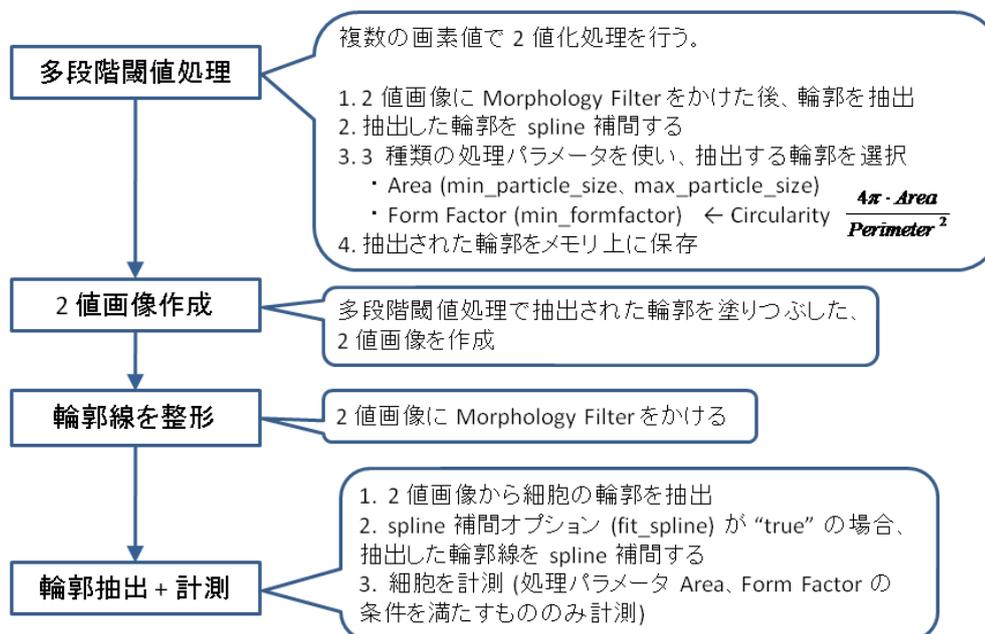
gaussian_blur_radius=2.0
rank_filter_radius=2.0
bilateral_spatial_radius=3.0
bilateral_range_radius=50.0

binary_iterations=3
threshold_offset=1
fit_spline=false
thresholding_range=20
thresholding_interval=1
min_formfactor=0.20
  
```

画像処理フィルタのパラメータ、抽出する細胞の条件 (サイズ、形状パラメータ) などを記述した text ファイル

処理開始時にパラメータファイルのパスを引数で指定する

輪郭抽出・計測



個々の細胞の計測結果

Total Measurements : 入力画像全体の計測結果

Cell Measurements : 個々の細胞の計測結果

[TotalMeasurements]										
	Area	Total	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	X	Y	...
1	1376256	1.44E+08	104.784	9.471	103	0	189	672	512...	

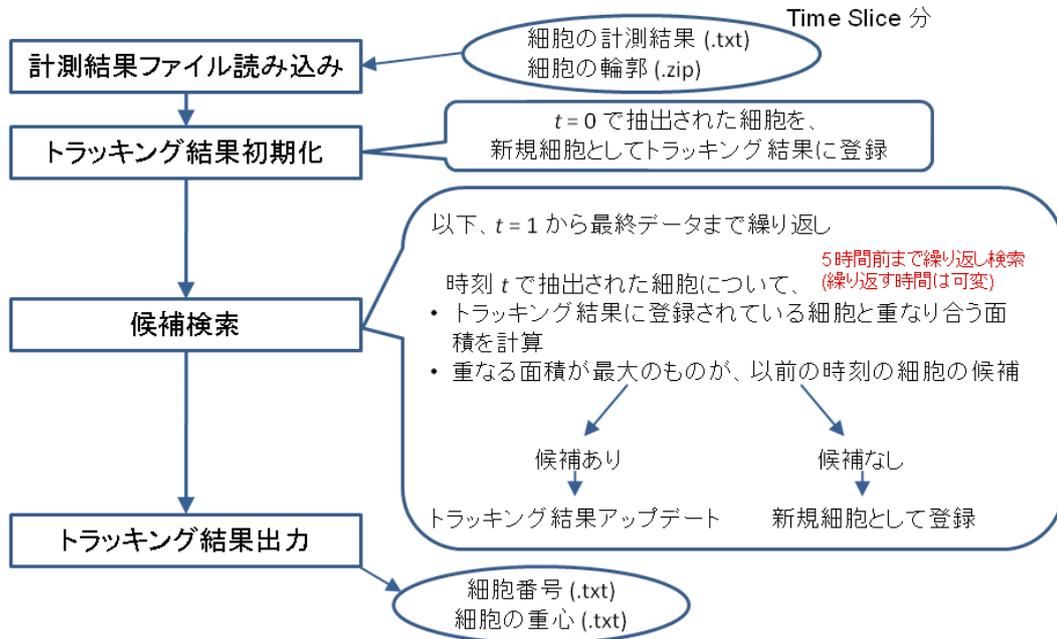
[CellMeasurements]										
	Area	Total	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	X	Y	...
1	820	92389	112.67	11.019	111	84	164	1135.322	226.384...	
2	1724	216746	125.723	11.659	125	76	160	608.527	307.584...	
3	2055	231703	112.751	8.872	111	68	145	964.051	537.261...	
4	698	77154	110.536	8.529	107	85	146	971.106	707.298...	
										:

輪郭線の zip ファイル

抽出された細胞の輪郭線を ImageJ の ROI (Region of Interest) ファイルフォーマットに変換し、抽出した細胞の個数分の ROI ファイルを1ファイルにまとめた zip ファイル

Name	Mod
1.roi	200
2.roi	200
3.roi	200
4.roi	200
5.roi	200
6.roi	200
7.roi	200
...	...

トラッキングツール



トラッキングツール 出力

1. トラッキングされた細胞番号を出力した text ファイル

時刻 t における細胞番号を出力。出力が "0" の場合はトラッキングされていない

	t									
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

細胞番号

1細胞のトラッキング結果

2. トラッキングされた細胞の重心を出力した text ファイル

細胞の重心 (cx, cy) を出力。出力が (0, 0) の場合はトラッキングされていない

	t			
	1791.931, 120.378	796.251, 133.9	794.781, 145.428	798.027, 176.019
	2416.171, 275.853	405.011, 270.865	402.581, 268.184	401.833, 272.144
	328.583, 724.441	21.839, 714.419	0.0, 0.0	0.0, 0.0
	41282.298, 965.792	1298.356, 954.268	0.0, 0.0	0.0, 0.0
	50.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0
	60.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0
	70.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0
	80.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0	0.0, 0.0

細胞番号

1細胞のトラッキング結果

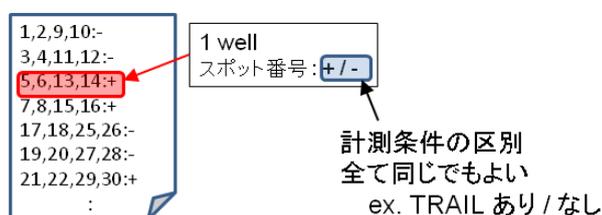
時系列統計データ出力ツール

入力データ

1. 個々の細胞の計測結果 (時系列分)
2. トラッキング結果 (細胞番号)
3. Well のリストファイル

出力データ (2 種類 → コマンドオプションで選択)

1. 抽出された細胞の個数、細胞の平均輝度を出力した text ファイル
2. 抽出された細胞の平均輝度、SE、細胞の個数の総和を出力した text ファイル



Well リストファイル例

1. 抽出された細胞の個数、細胞の平均輝度を出力した text ファイル

	1	2	3	...
well1-1	AV(1,1)	AV(1,2)
	No. of detected cells(1,1)	No. of detected cells(1,2)
well1-2	AV(2,1)	AV(2,2)
	No. of detected cells(2,1)	No. of detected cells(2,2)
well1-9	AV(9,1)	AV(9,2)
	No. of detected cells(9,1)	No. of detected cells(9,2)

2. 抽出された細胞の統計量を出力した text ファイル

	1	2	3	...
AV-	AV-(1)	AV-(2)
SE-	SE-(1)	SE-(2)
C-	C-(1)	C-(2)
AV+	AV+(1)	AV+(2)
SE+	SE+(1)	SE+(2)
C+	C+(1)	C+(2)
T	T(1)	T(2)

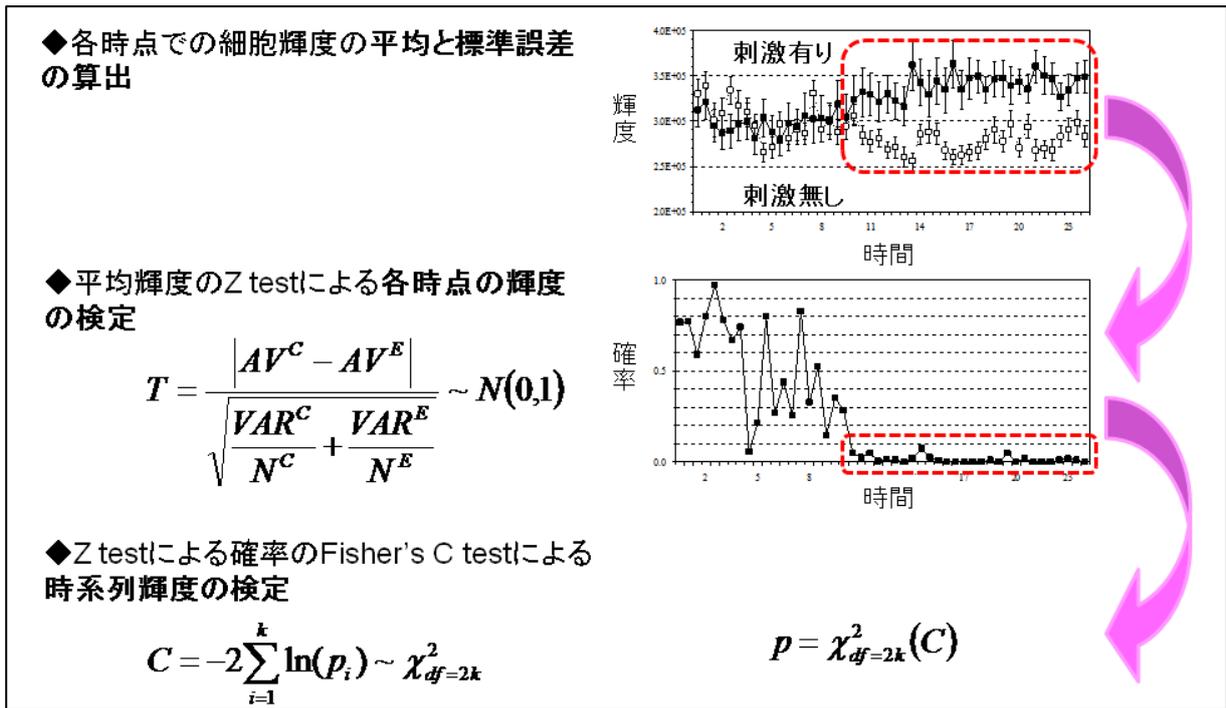


図 2(4)-1 時系列データ比較のための統計解析

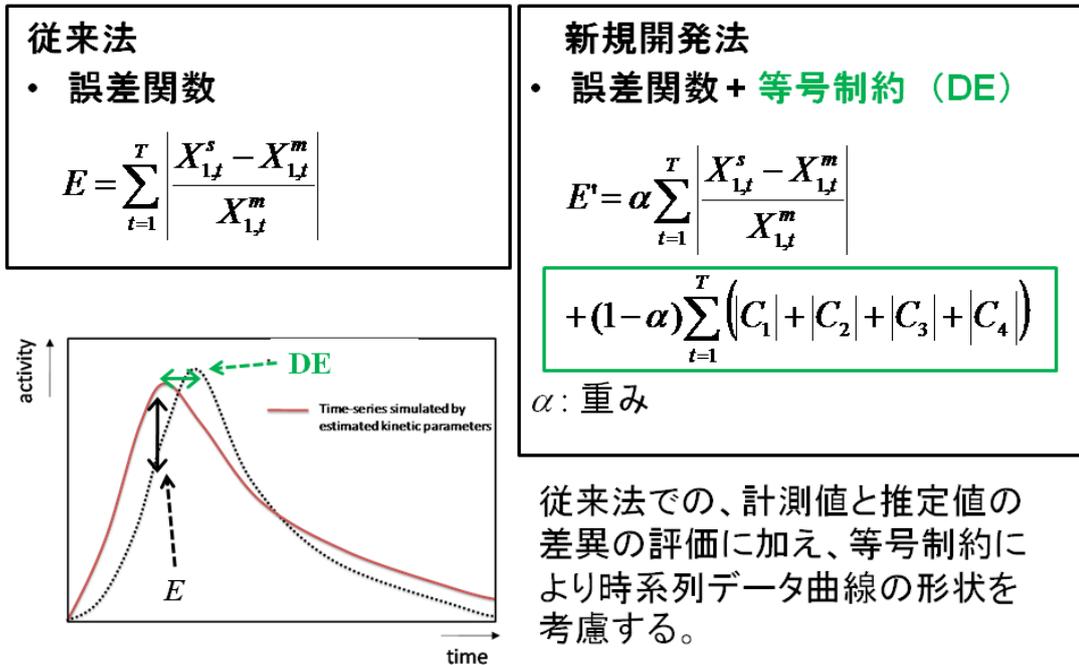


図 2(5)-1 新規パラメータ推定法の概略

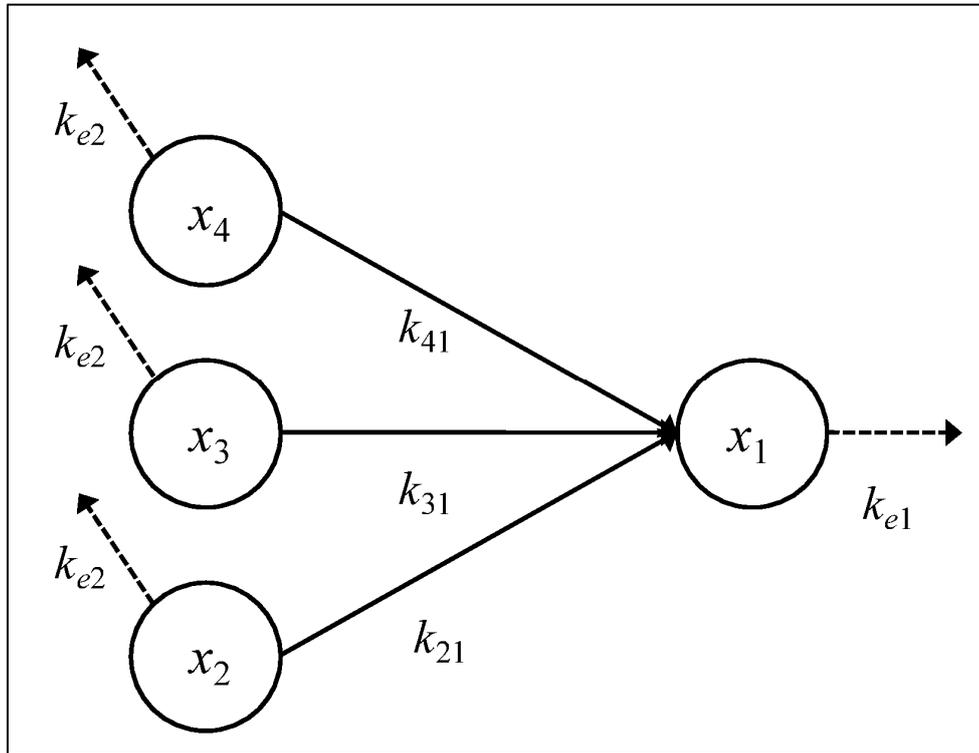


図 2(5)-2 モデル例

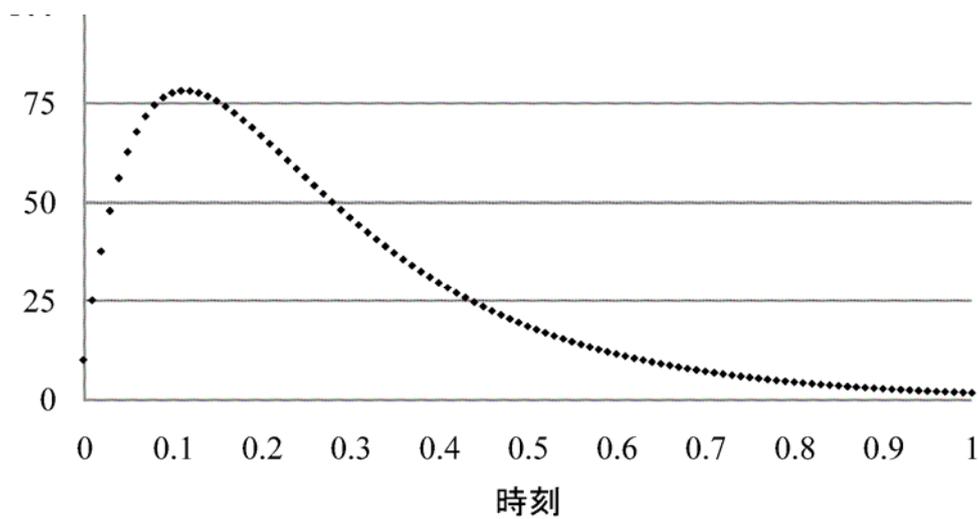


図 2(5)-3 図 2(5)-2 のモデルに基づき生成されたシミュレーション曲線

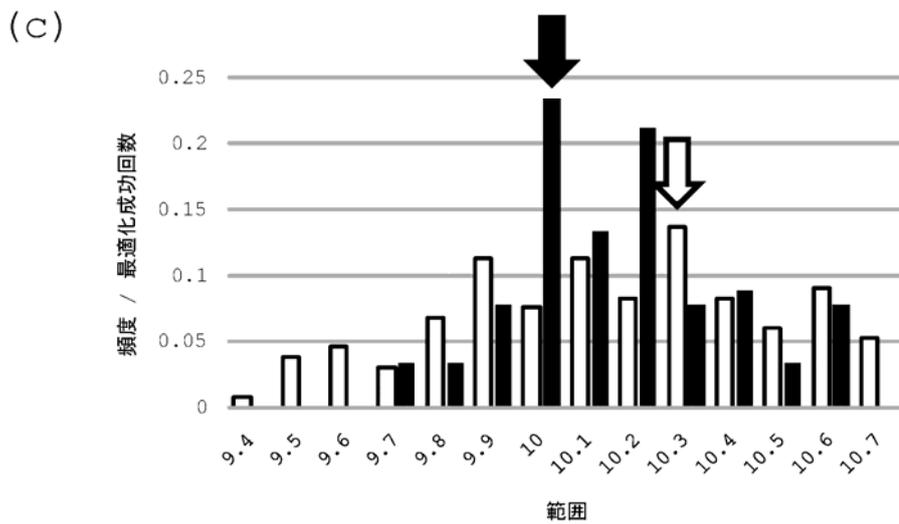
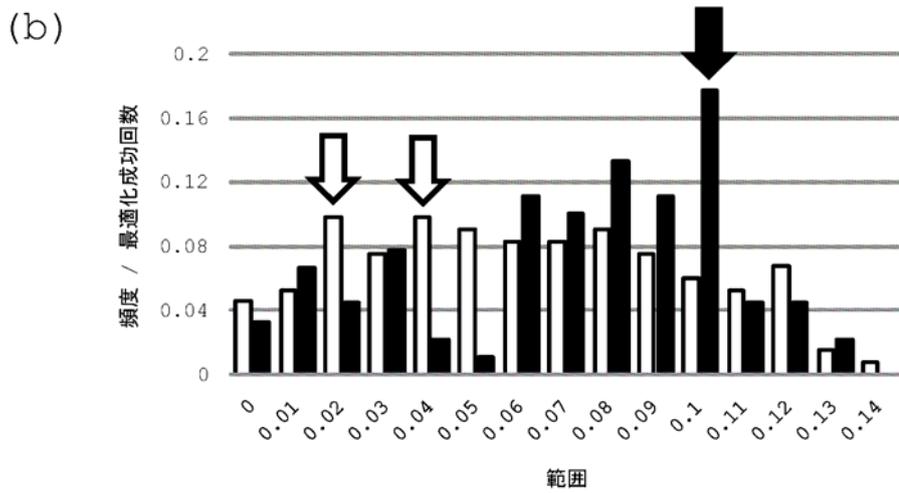
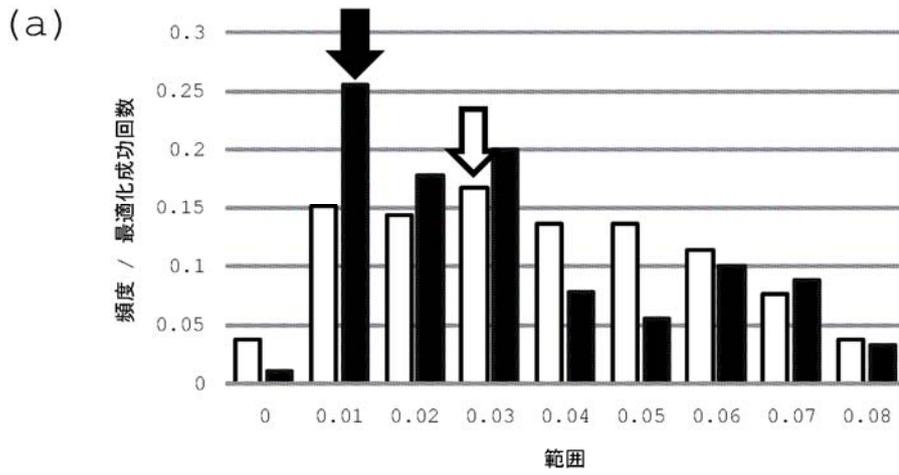


図 2(5)-4 パラメータ推定結果
新規開発法及び従来法の推定値を黒及び白矢印で示す。

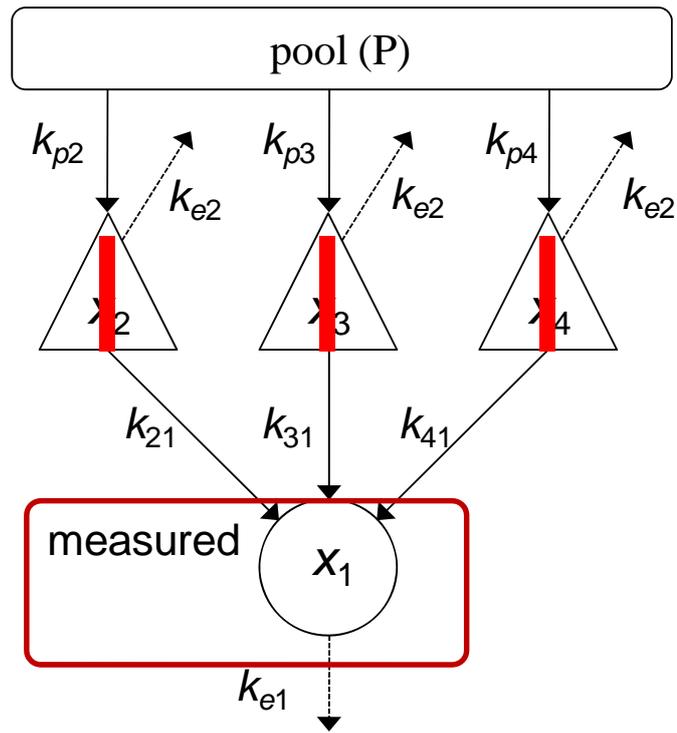


図 2(5)-5 実計測データを想定したモデル

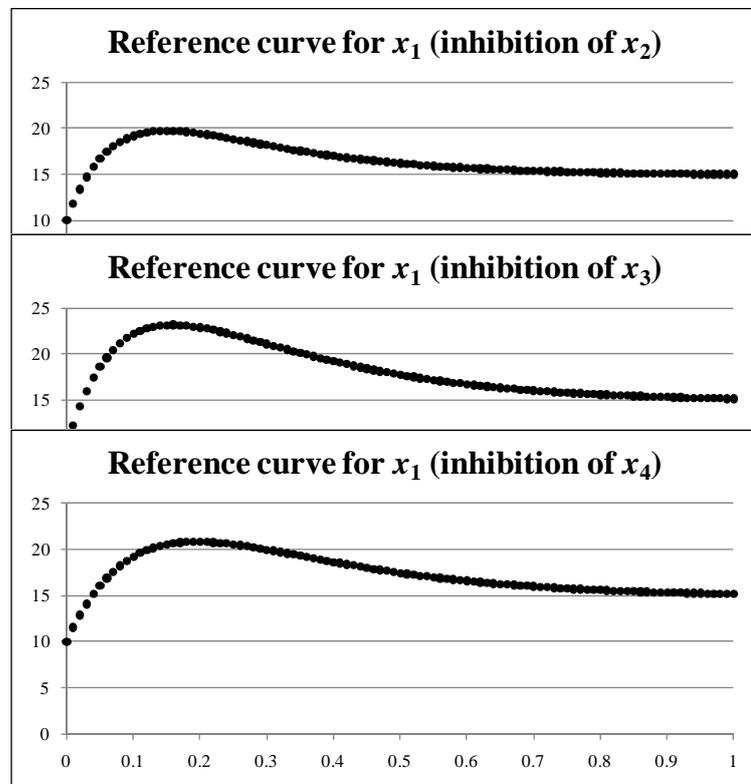


図 2(5)-6 図 2(5)-4 のモデルに基づき生成されたシミュレーション曲線

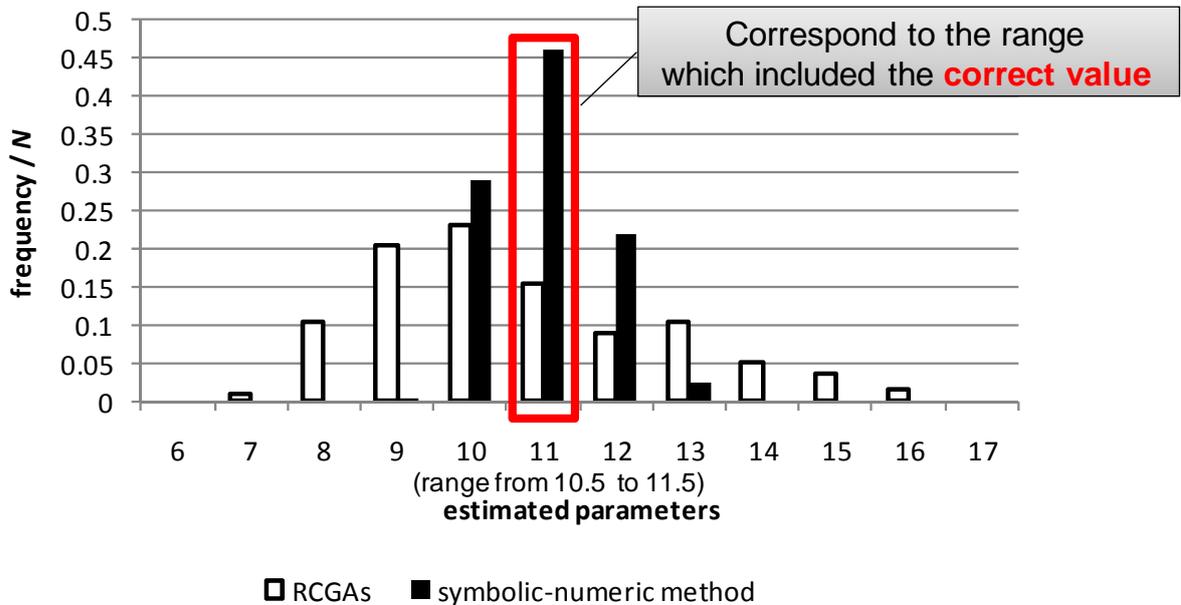
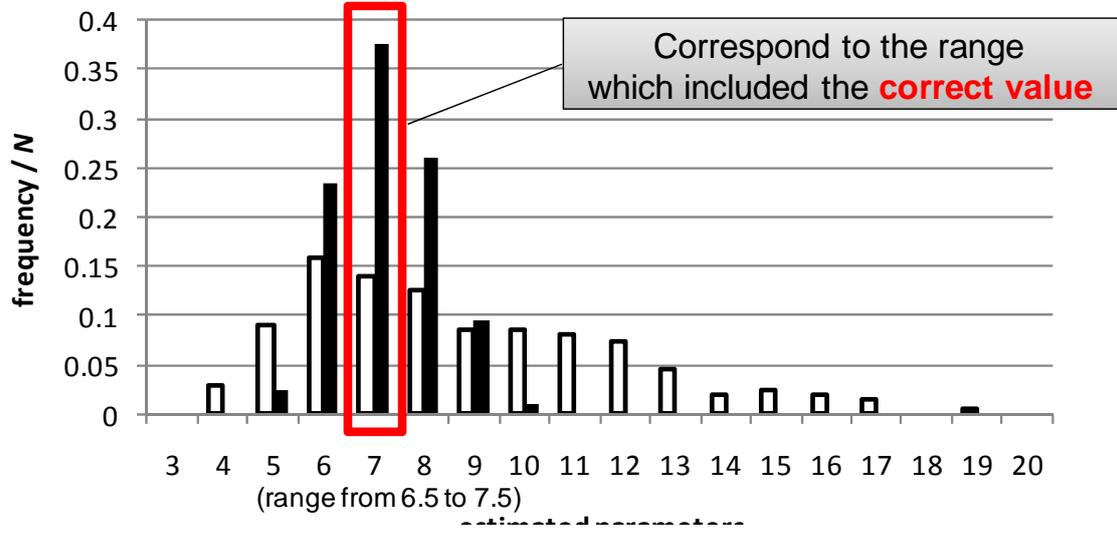
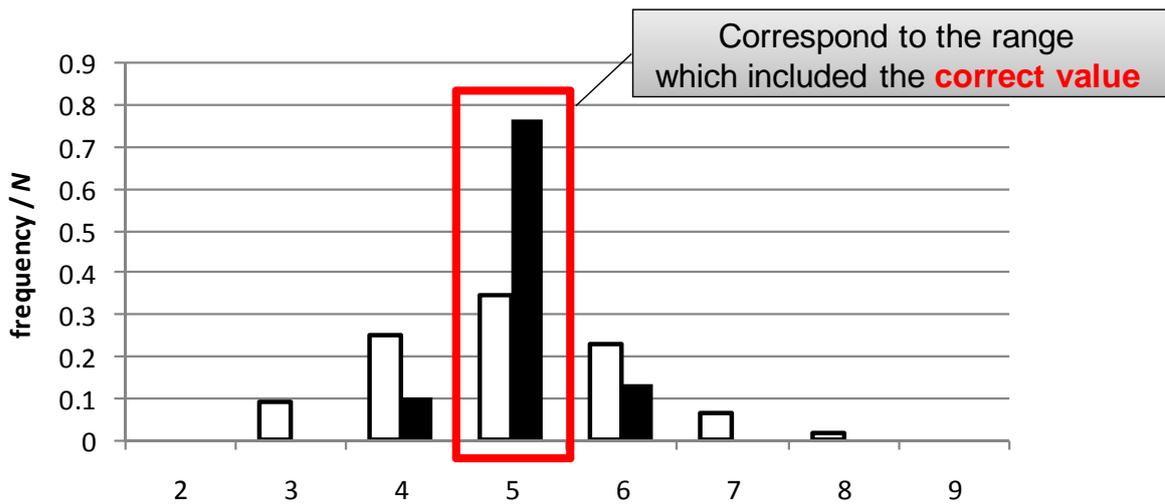


図 2(5)-7 パラメータ推定結果
 新規開発法及び従来法の推定値を黒及び白 bin で示す。



図 2(5)-8 新規開発法による増殖因子刺激応答主要パスウェイの推定

(第 2 章 2-6)

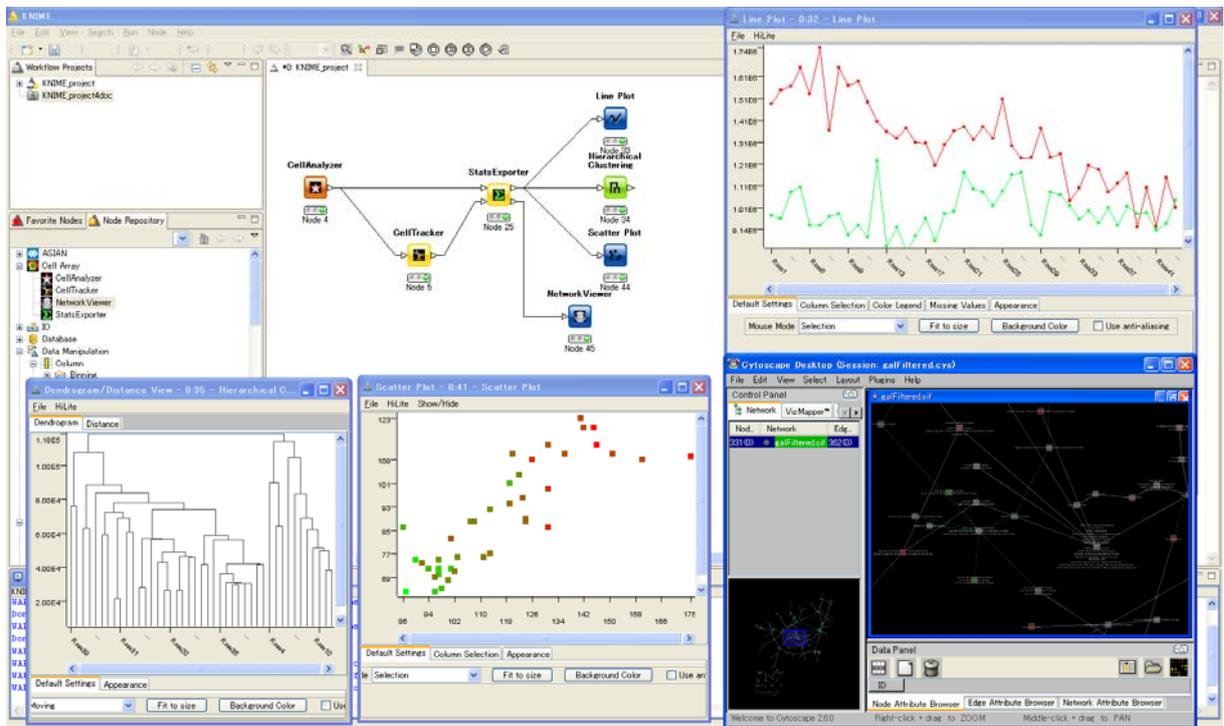


図 2(6)-1 Cell Array KNIME ワークフロー化

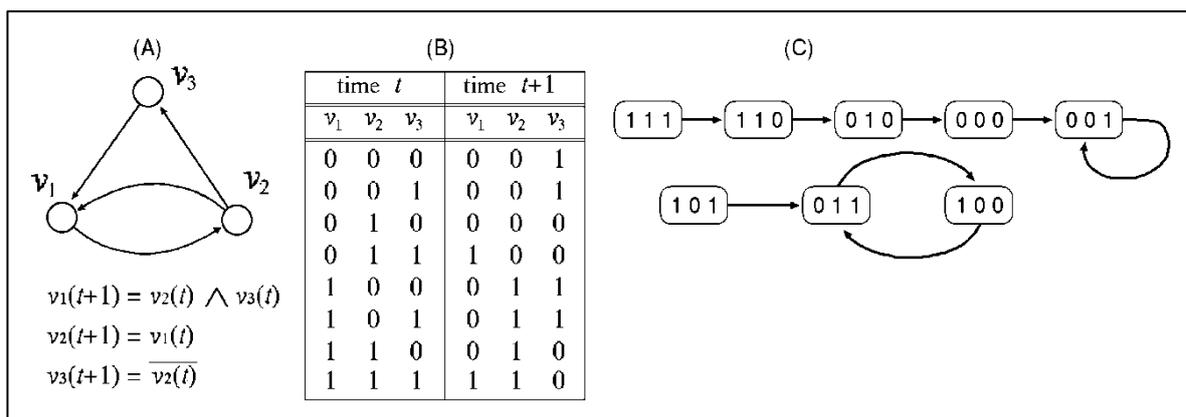


図 2(7)-1 ブーリアンネットワークの例 (A) と、それに対する状態遷移表 (B)、および、状態遷移ダイアグラム (C)。

$$\begin{aligned}
 v_1(t+1) = v_2(t) \wedge v_3(t) &\Leftrightarrow v_1 = v_2 \wedge v_3 \\
 &\Leftrightarrow (\overline{v_1} \vee (v_2 \wedge v_3)) \wedge (v_1 \vee \overline{(v_2 \wedge v_3)}) \\
 &\Leftrightarrow (\overline{v_1} \vee v_2) \wedge (\overline{v_1} \vee v_3) \wedge (v_1 \vee \overline{v_2} \vee \overline{v_3})
 \end{aligned}$$

図 2(7)-2 ブーリアンネットワークの定常状態検出問題における制御規則から論理式充足可能性問題における論理積標準形への変換の例。

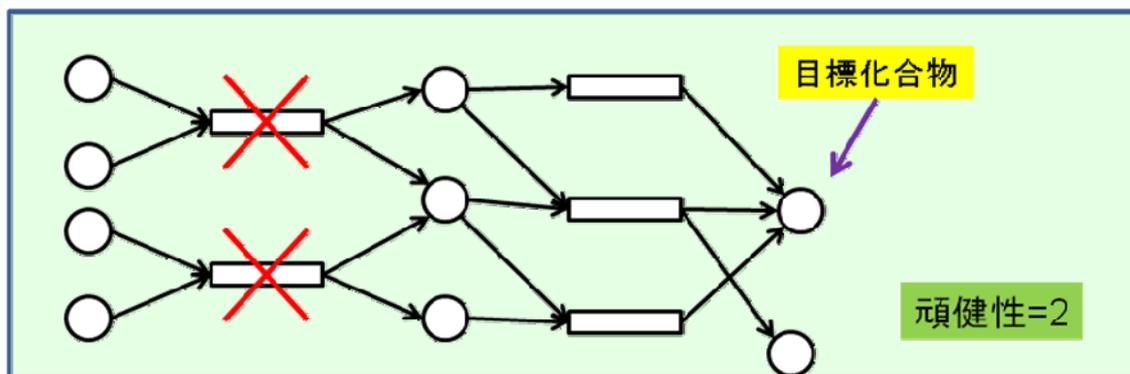


図 2(7)-3 代謝ネットワークの頑健性。この図では丸が化合物ノードを表し、長方形が化学反応ノードを表す。目標化合物を生成不能とするには赤い×印で示した2種類の反応を不活性化させる必要があるので頑健性が2となる。

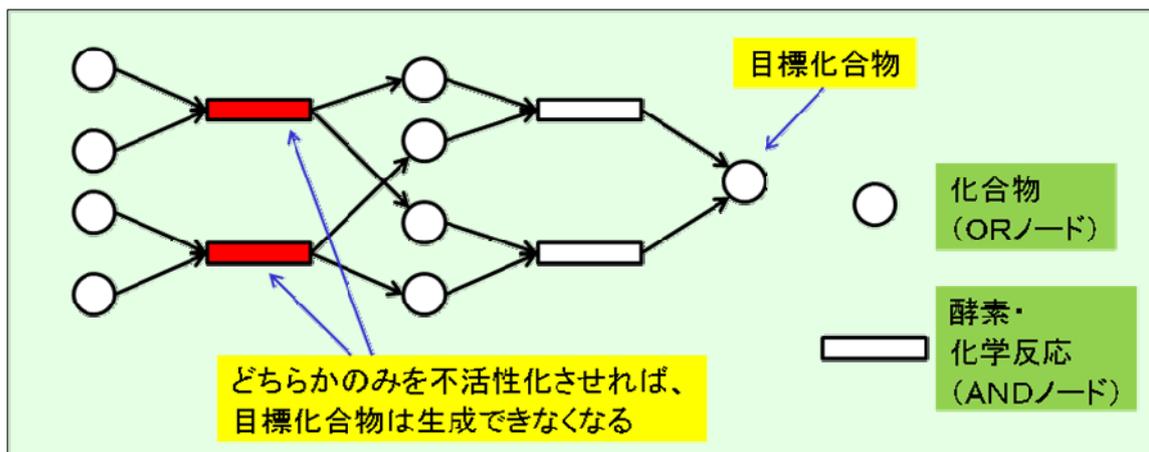


図 2(7)-4 代謝ネットワークのブーリアンネットワークによるモデル化。化合物は OR 頂点に対応し、化学反応（≒酵素）は AND 頂点に対応する。この図の場合には、赤で示した反応の一方のみを不活性化させれば、目標化合物が生成不可能となる。

表 2(7)-1 代謝ネットワークにおける頑健性解析結果。

それぞれの数値は対象となる化合物を生成不能とするには最小で何個の反応（≒酵素）を同時に不活性化する必要があるかを示している。

	C00022 ピルビン酸	C00024 アセチル CoA	C00033 酢酸	C00036 オキサロ酢酸	C00074 ホスホエノールピルビン酸	5 個 全て
ヒト (hsa)	2	2	2	4	3	4
酵母 (sce)	2	1	1	3	2	3
古細菌 (hal)	1	2	2	2	0	2
大腸菌 (eco)	2	2	2	3	2	4

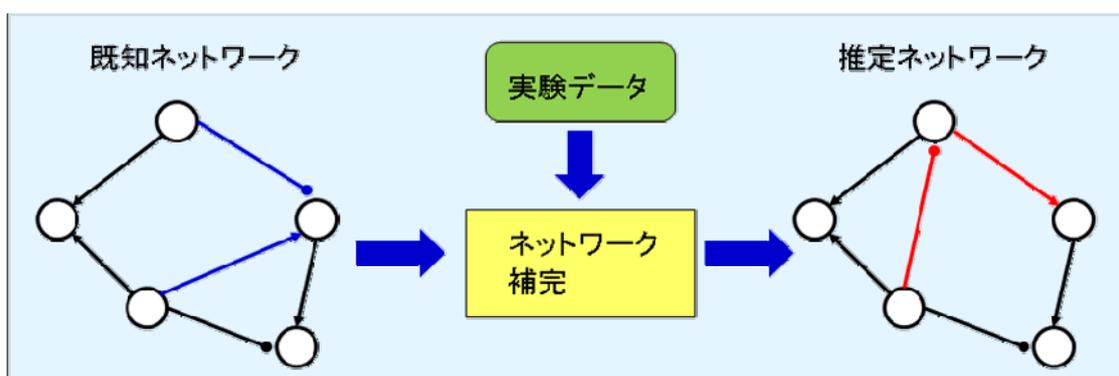


図 2(7)-5 ネットワーク補完（概念図）。

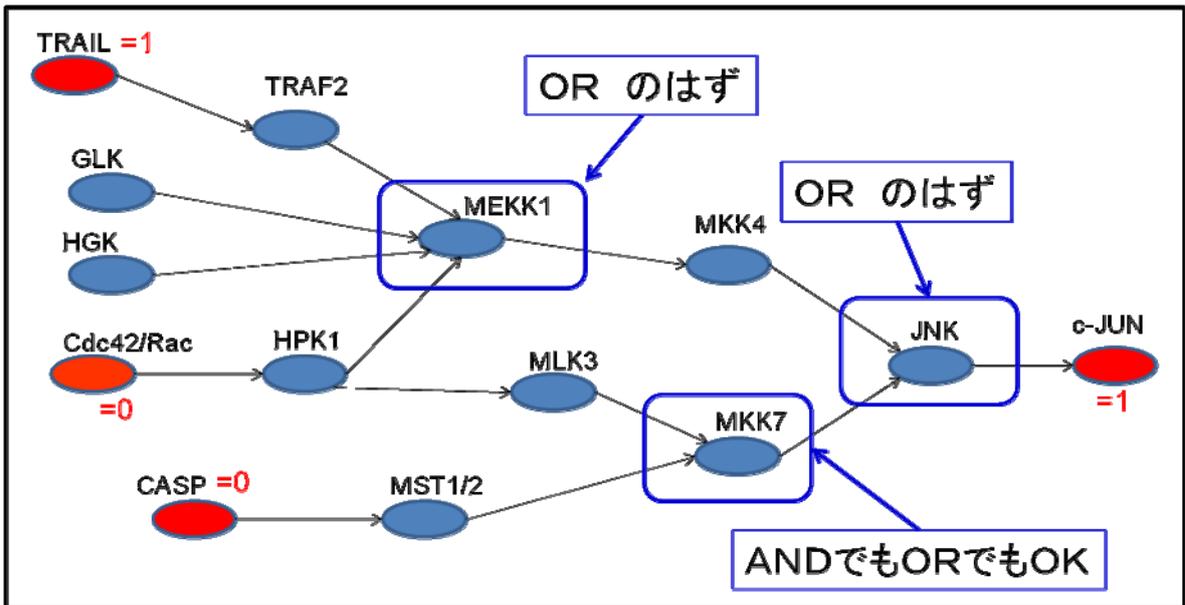


図 2(7)-6 シグナル伝達ネットワークのブーリアンモデルにおけるネットワーク補完の概念図。

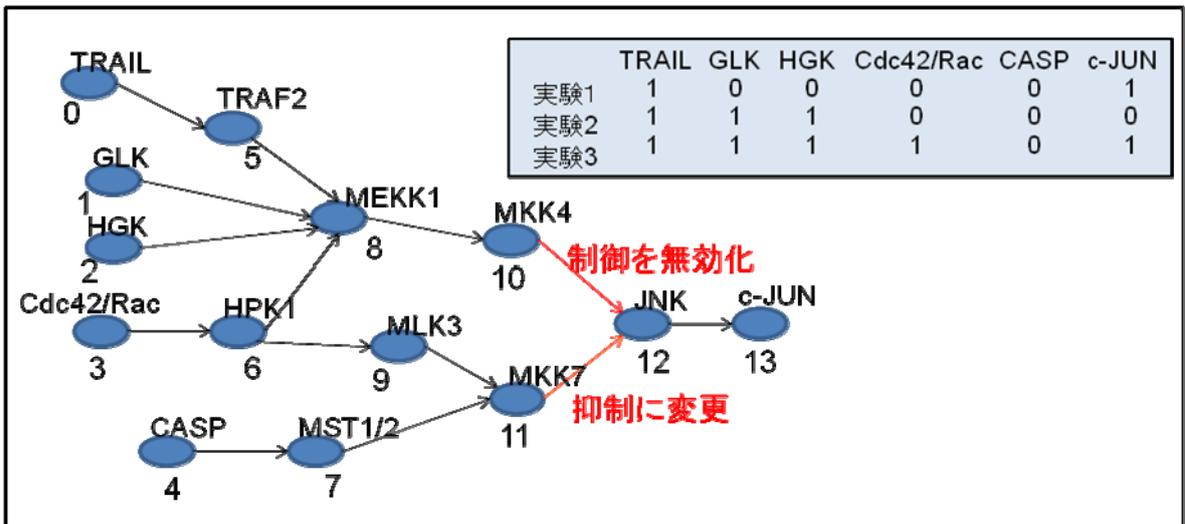


図 2(7)-7 シグナル伝達ネットワークに整数計画法に基づくネットワーク補完手法を適用した結果。

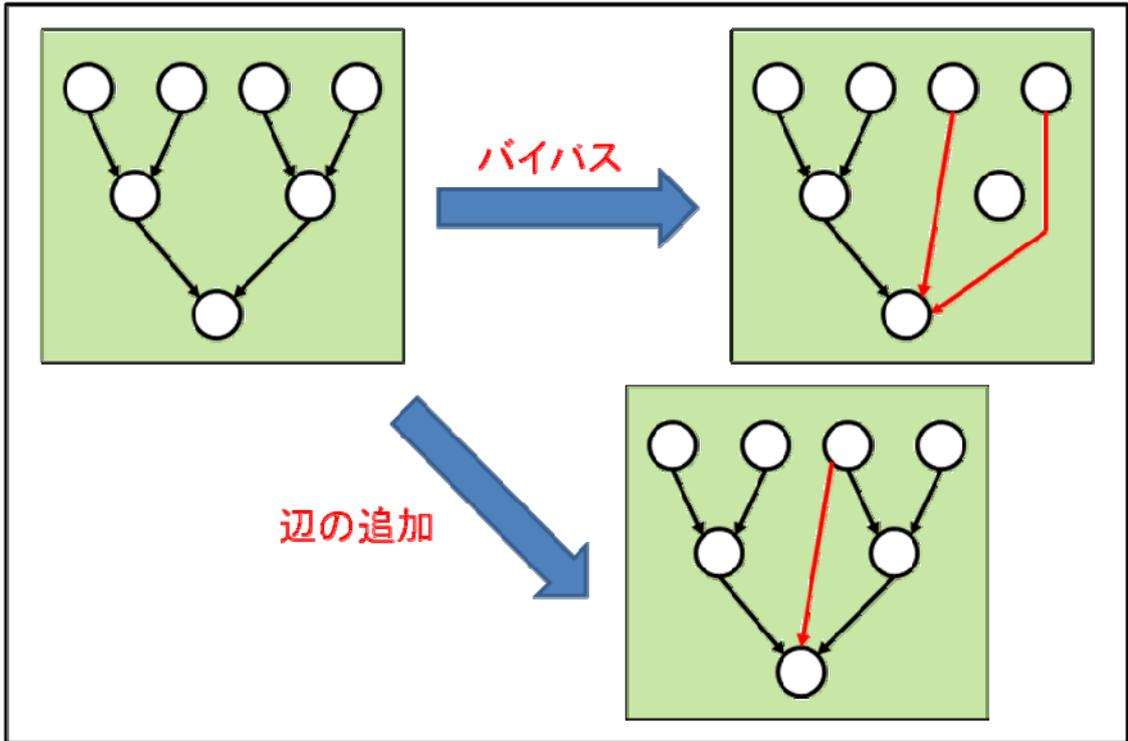


図 2(7)-8 最小二乗法を用いたネットワーク補完アルゴリズムにおける二種類の局所補完方式。

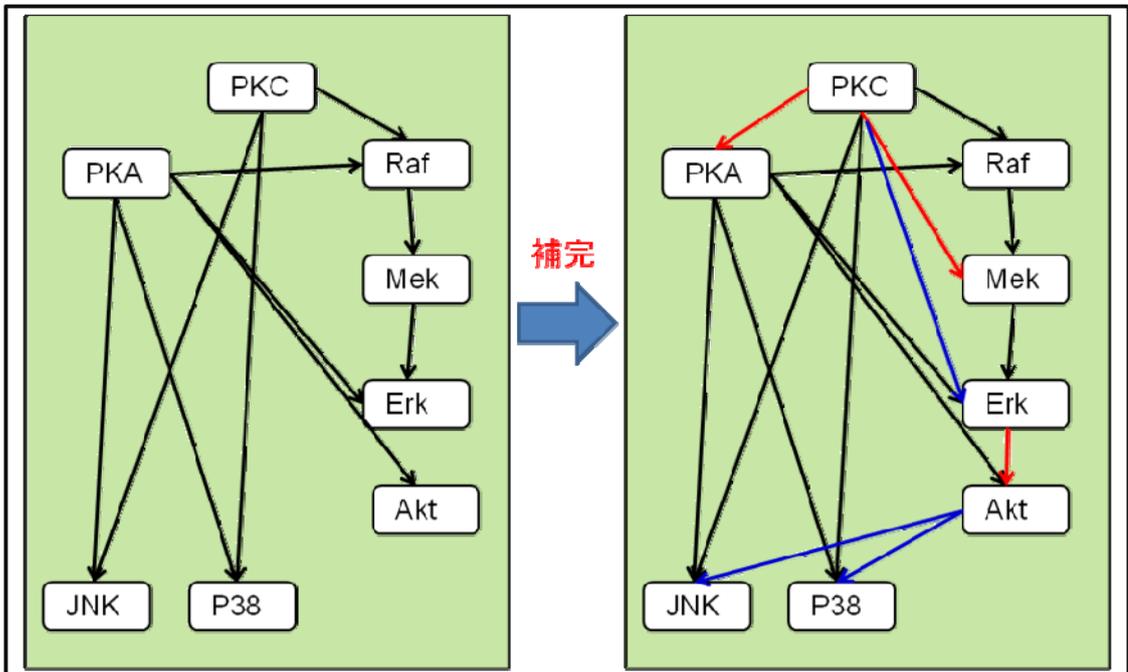


図 2(7)-9 最小二乗法を用いたネットワーク補完アルゴリズムによるシグナル伝達ネットワークの補完結果。赤色と青色の辺が補完により新たに追加された。

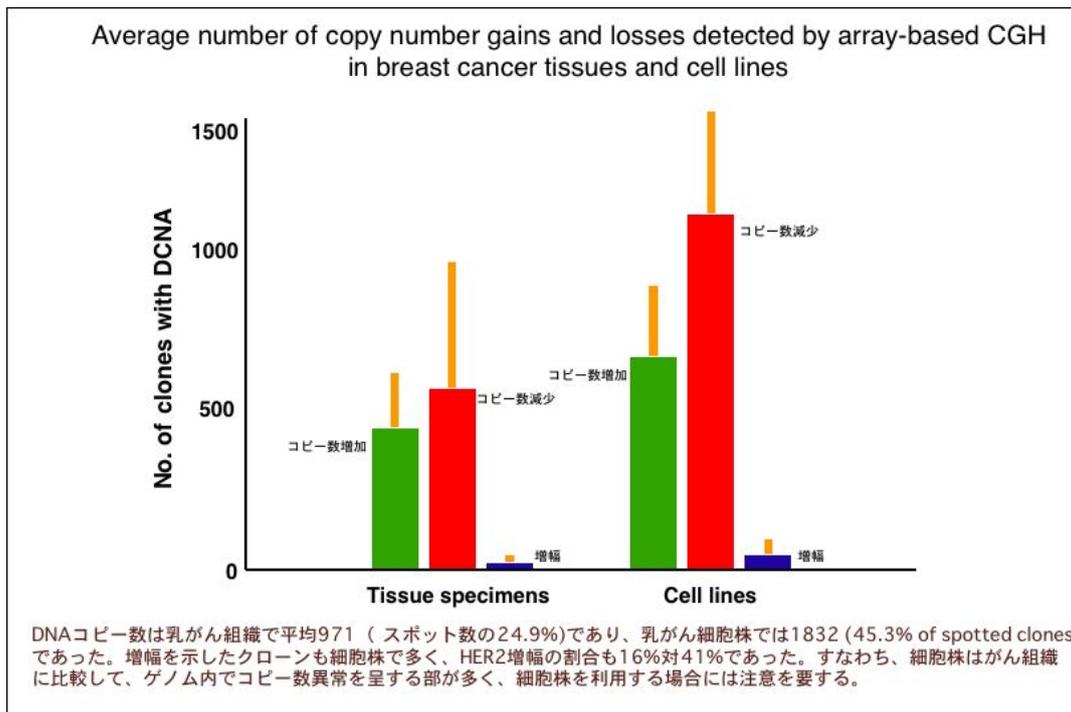


図 2(8)-1

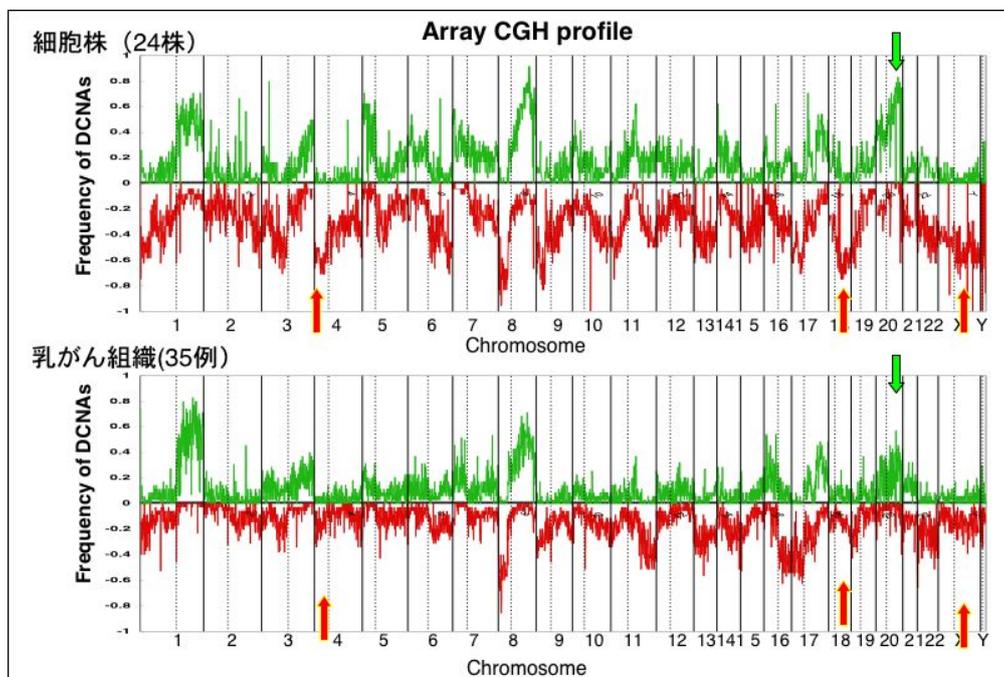
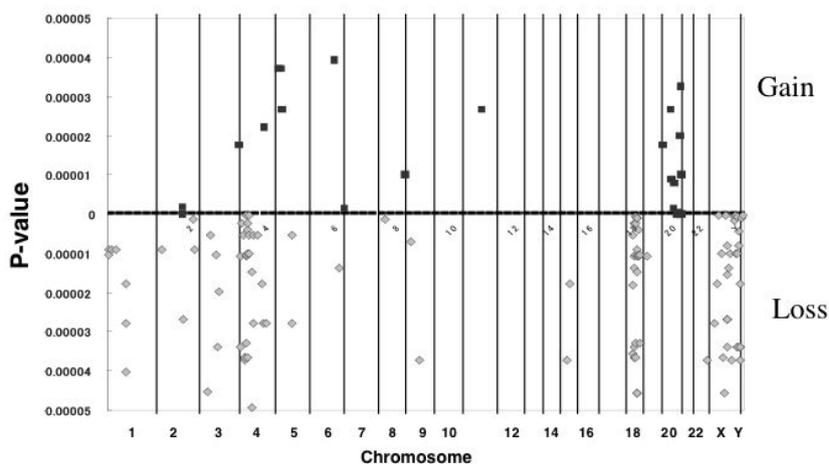


図 2(8)-2

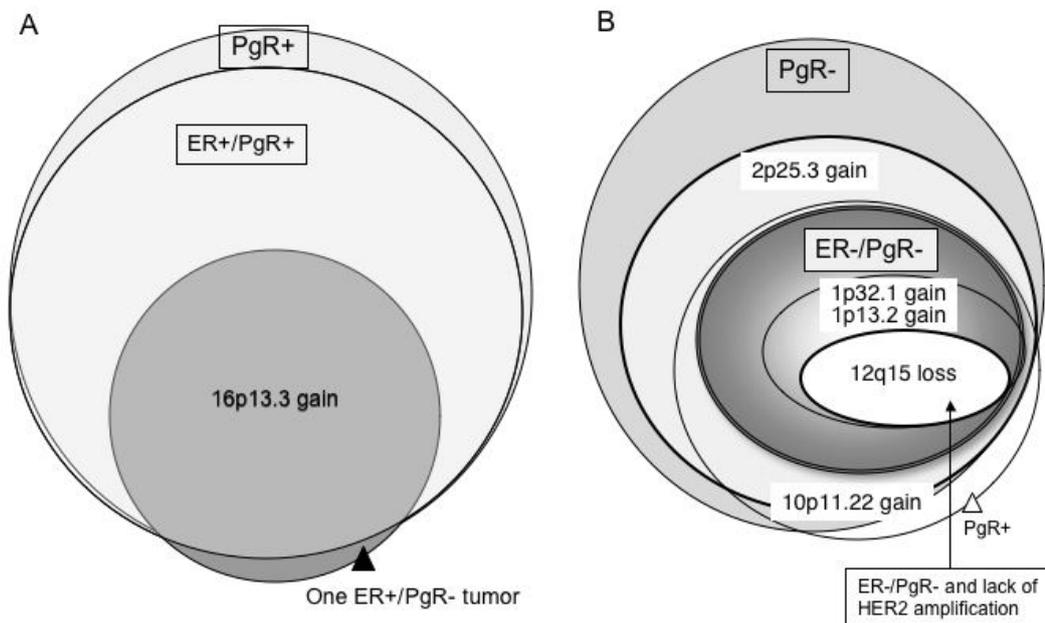
P-values and chromosomal regions with significant difference in the frequency of DNA copy number gains



乳がん細胞株でのみコピー数増加がみられたのは20q11と20q13である。細胞株でのみ減少が見られたのは4p13-14, 18q12, 18q21, Xq21, Xq26-28であり、これらのゲノム異常は細胞株に特異的な変化であり、生体内ではなかった異常 (in vitroで生じた) と考えられた。この図ではp値は0.00005以下の有意差のみを提示する。

図 2(8)-3

Hormone receptor status vs. DNA copy number aberrations in breast cancers



The relationship between the DCNAs and hormone receptor status in breast cancer. Based on the PgR expression status, breast cancers are conveniently divided into two groups, 28 PgR+ and 18 PgR- tumors. PgR+ tumors consist of 25ER+/PgR+ and 3 ER-/PgR+ tumors. Of 25 ER+/PgR+ tumors 12 exhibit 16p13.3 gain. This copy number aberration is detected in only one of the PgR- tumors (solid arrow head) (A). In contrast, 10 of 18 PgR- tumors show 2p25.3 gain, and furthermore, 8 of these 10 tumors show 10p11.22 gain, which is also detected in 2 PgR+ tumors (open arrow head). All of 6 ER-/PgR- tumors, which include 3 so-called 'triple-negative' cancers, show both copy number aberrations, and furthermore, 4 of these 6 tumors exhibit 1p32.1 and 1p13.2 gains. A loss of 12q15 is detected exclusively in these so-called 'triple-negative' cancers (indicated by an arrow). Tumors with gains of 2p25.3, 1p32.1, or 1p13.2 are included in the PgR- tumor group (B).

図 2(8)-4

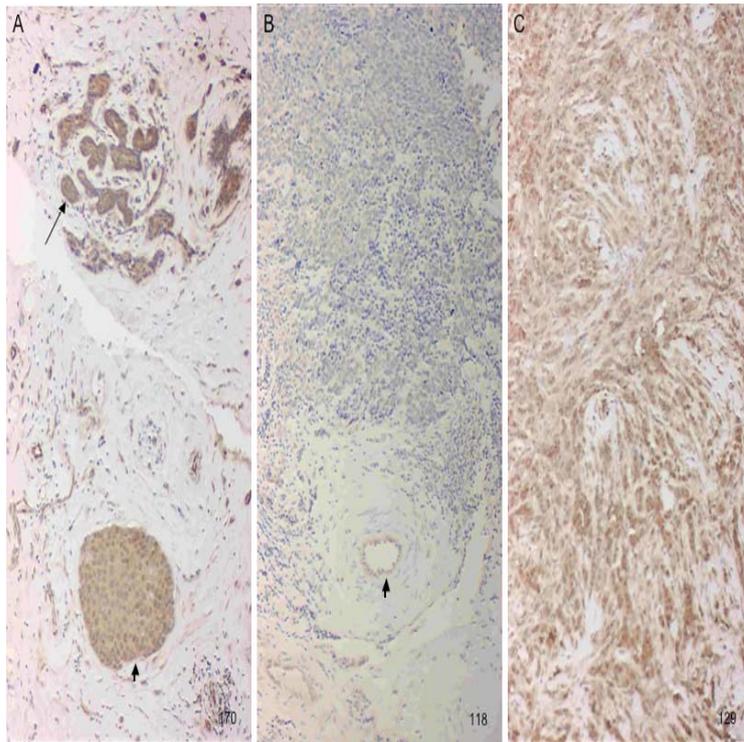


図 2(8)-5 A と C とでは 12q15 のコピー数減少が見られない症例であり、免疫組織化学では”A”の発現が認められる。一方、12q15 のコピー数減少を呈した、triple negative 乳癌では、その発現は陰性であった。

Effects of “A” to proliferation of breast cancer cell lines

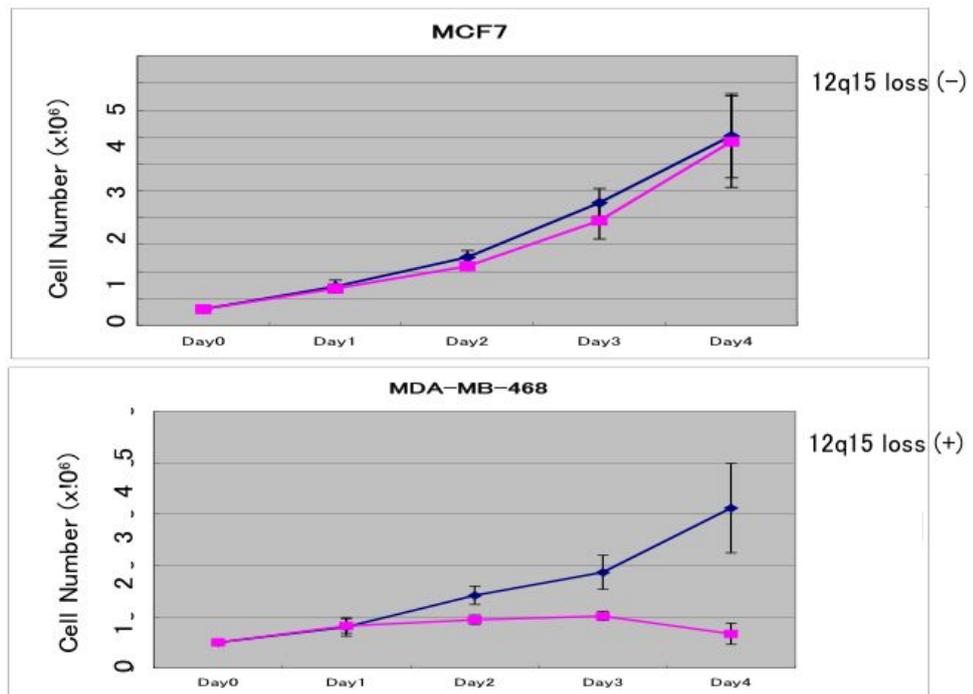


図 2(8)-6

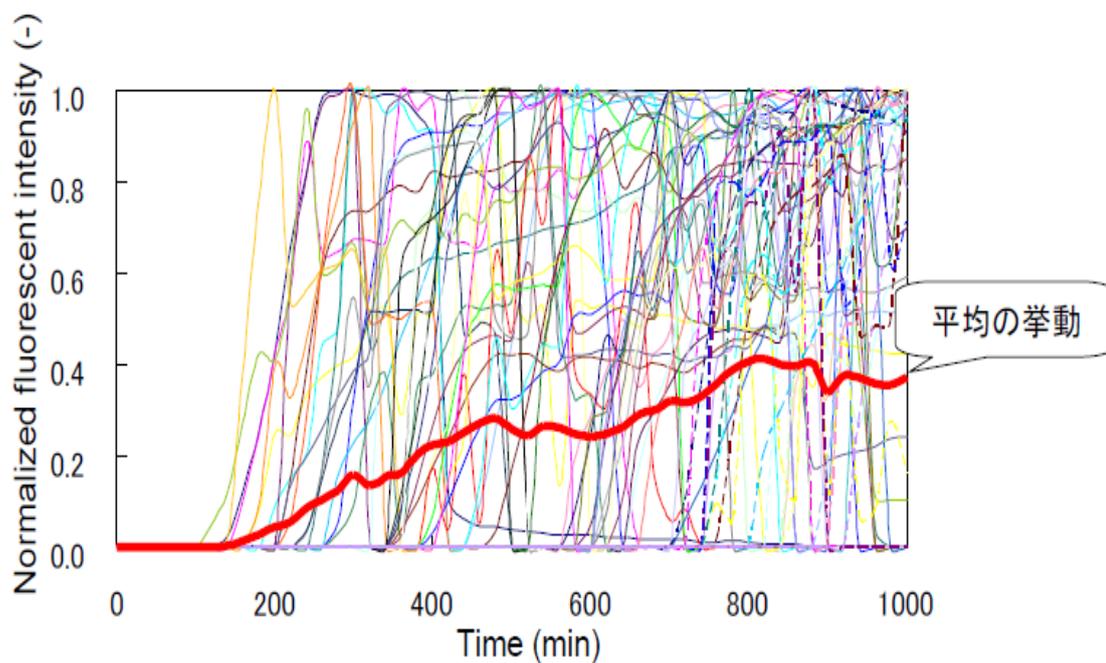


図 2(9)-1 細胞毎の EGFP の経時的挙動

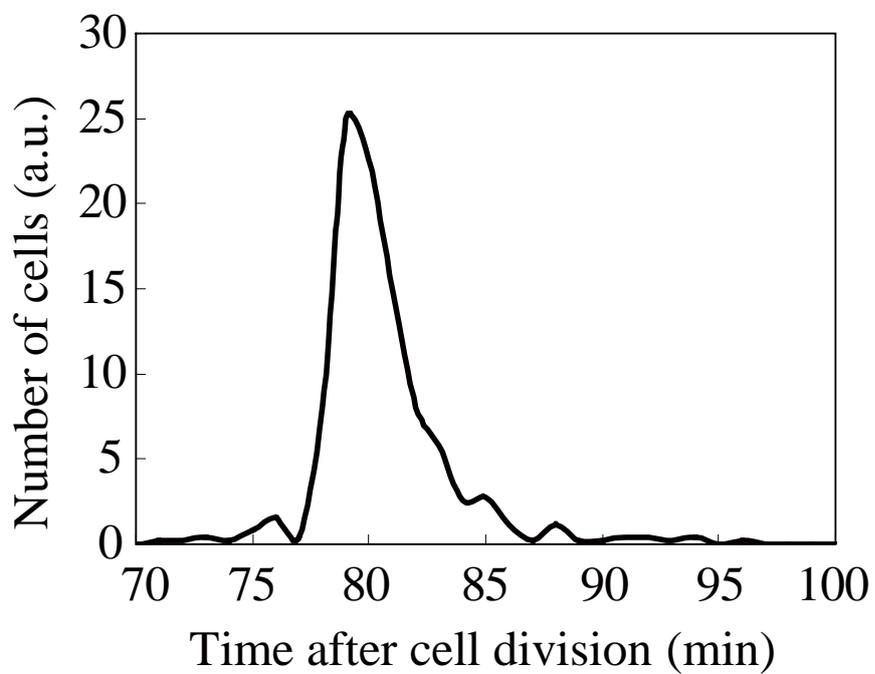


図 2(9)-2 細胞分裂から遺伝子発現開始までに各細胞が要した時間の頻度分布

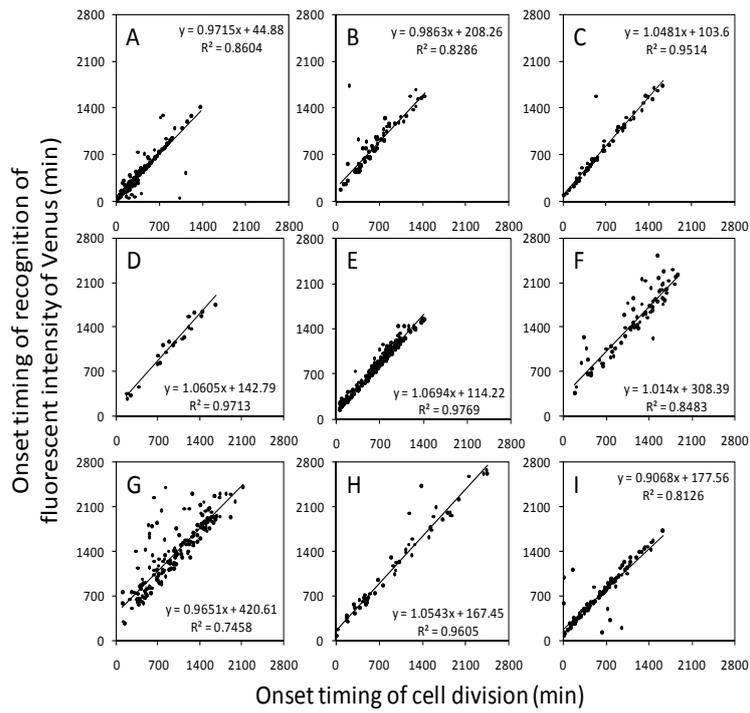


図2(9)-3 9つのトランスフェクション試薬を用いて細胞分裂と遺伝子発現開始の相関

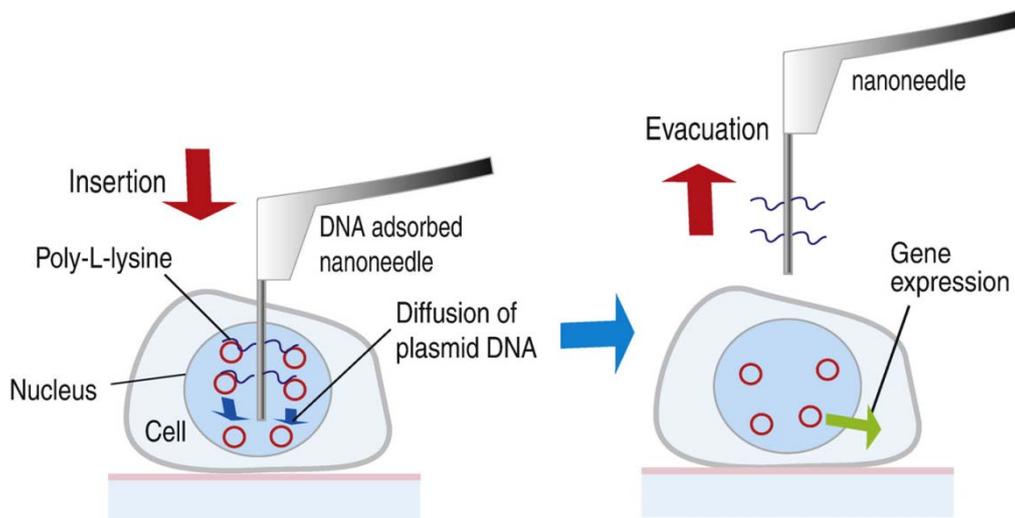


図 2(9)-4 ナノ針による直接核内に遺伝子を送達する方法

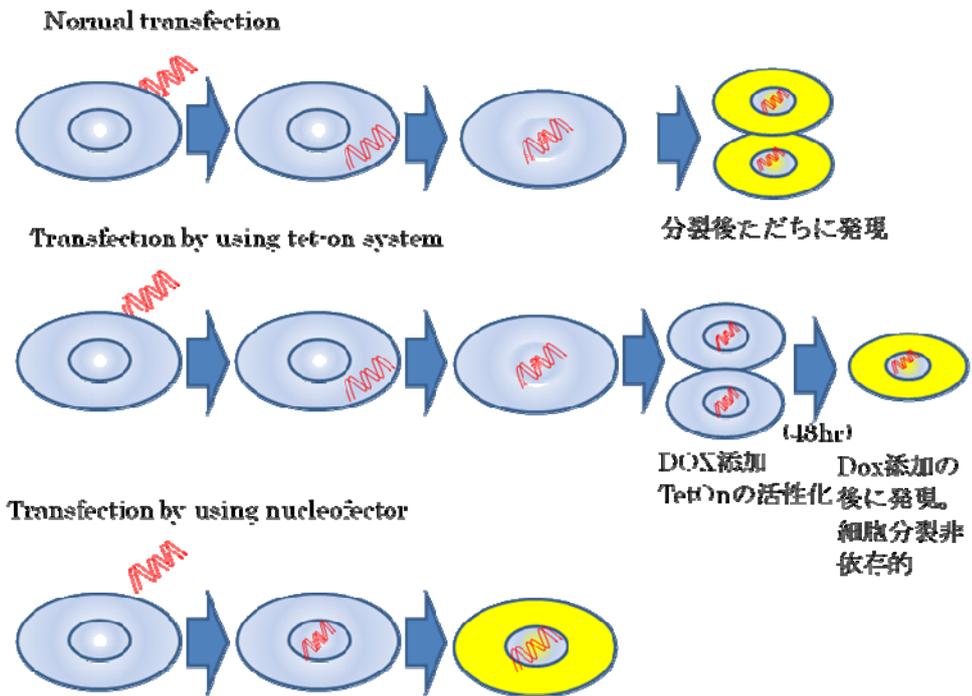


図 2(9)-5 遺伝子導入メカニズムの細胞周期依存性、核膜移行依存性に対するアプローチ方法

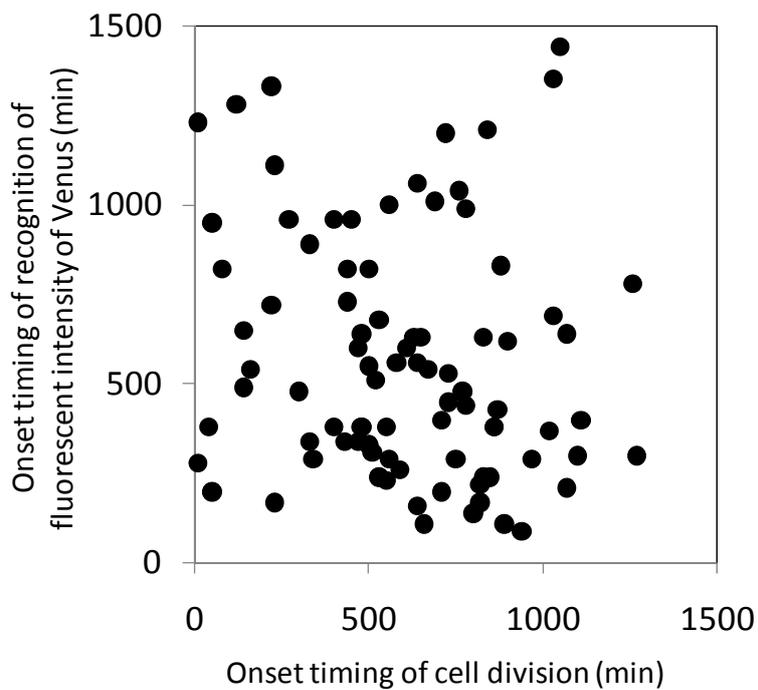


図 2(9)-6 Tet-system を用いた時の細胞分裂と遺伝子発現開始時間の相関性

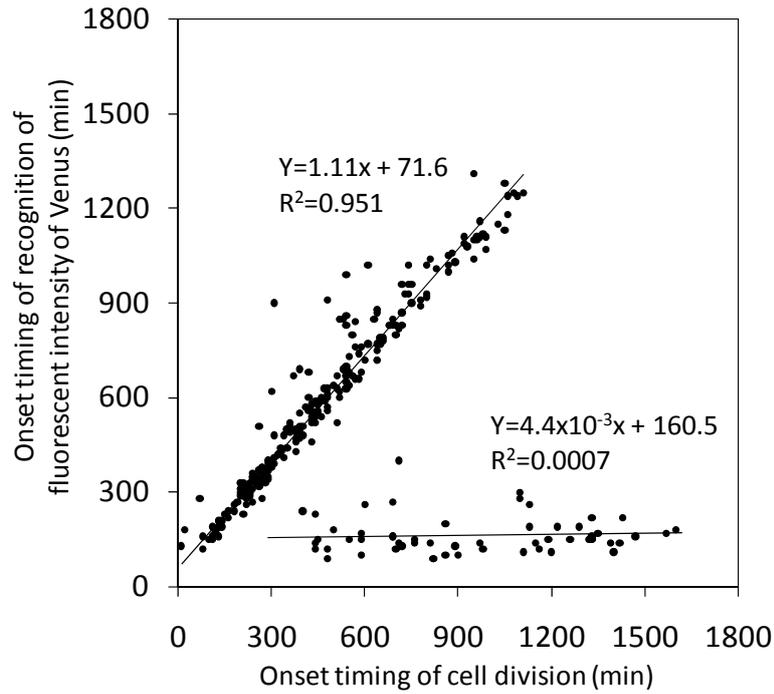


図 2(9)-7 Electroporation を用いた時の細胞分裂と遺伝子発現開始時間の相関性

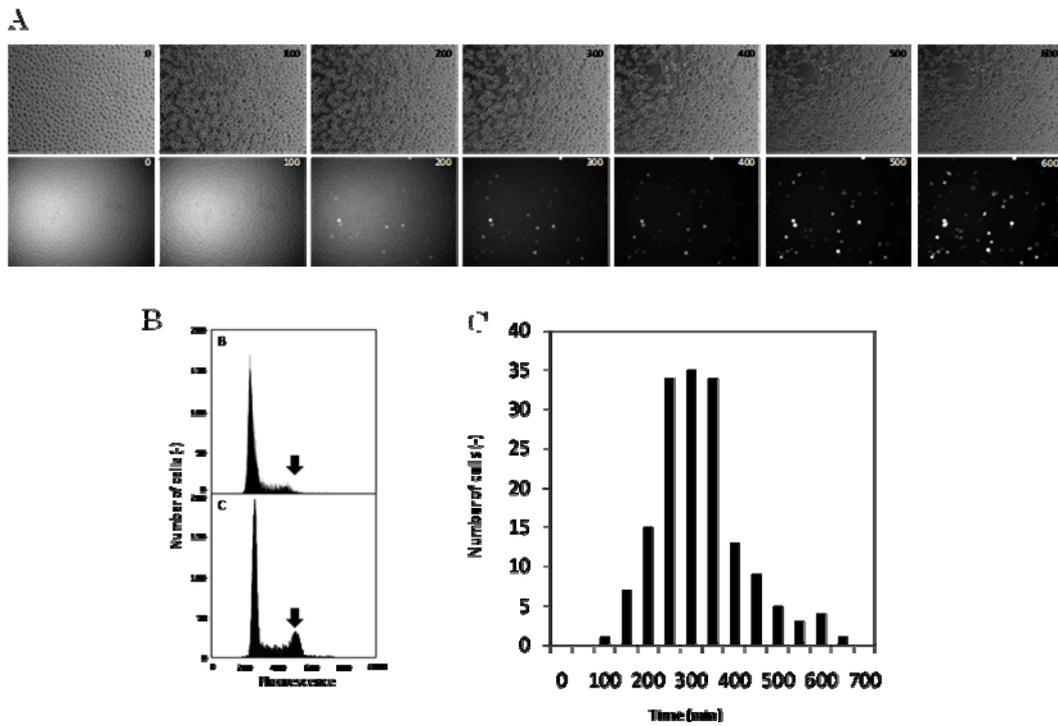


図 2(9)-8 細胞周期を停止させた状態におけるエレクトロポレーションによる遺伝子導入の結果

- A) 位相差画像および蛍光画像の時系列画像 (各 100 分間隔)
- B) 細胞周期を停止させたときのフローサイトメトリの結果
- C) 遺伝子導入から各細胞が遺伝子を発現するまでの時間の頻度分布

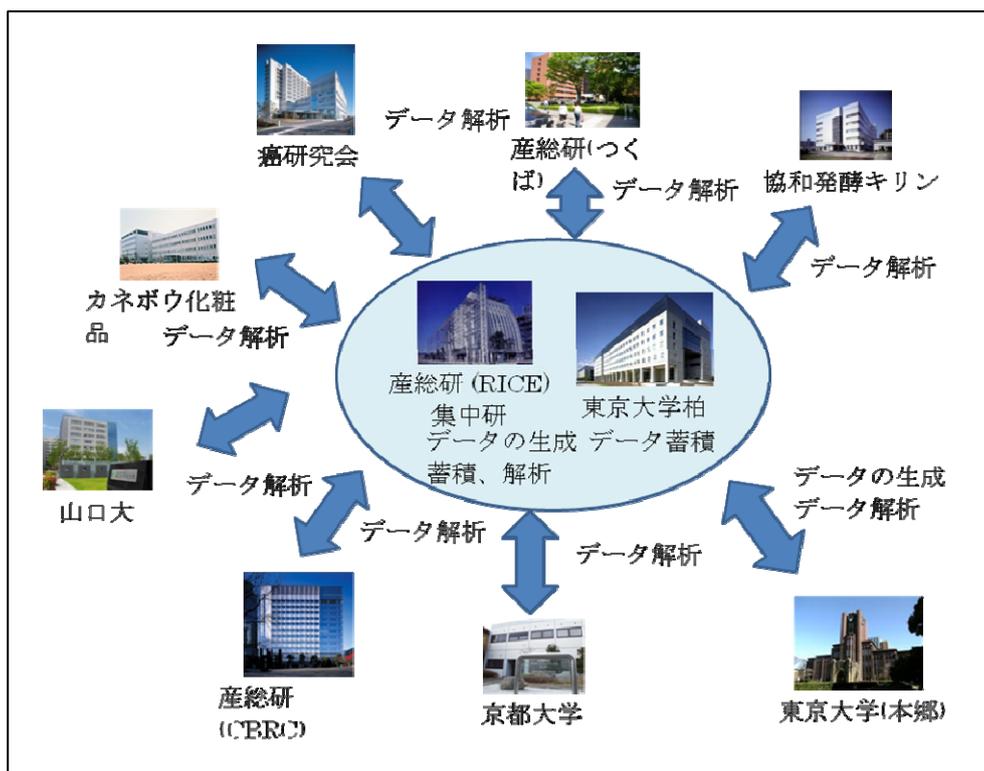


図 2(10)-1 データストレージ運用図

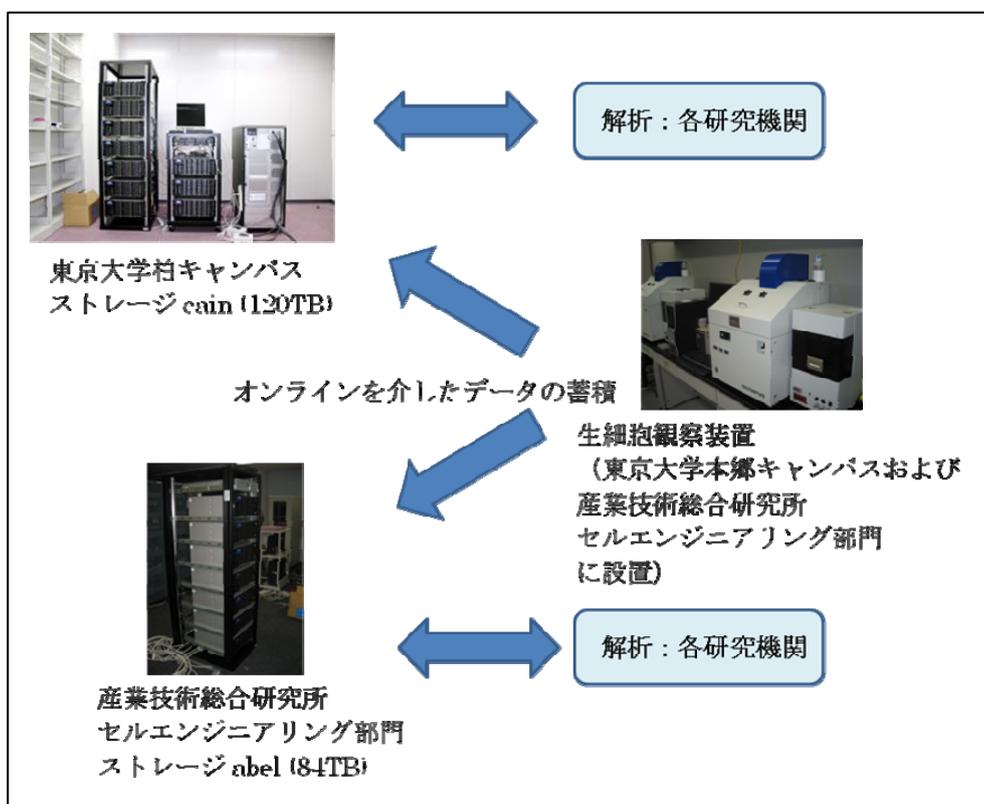
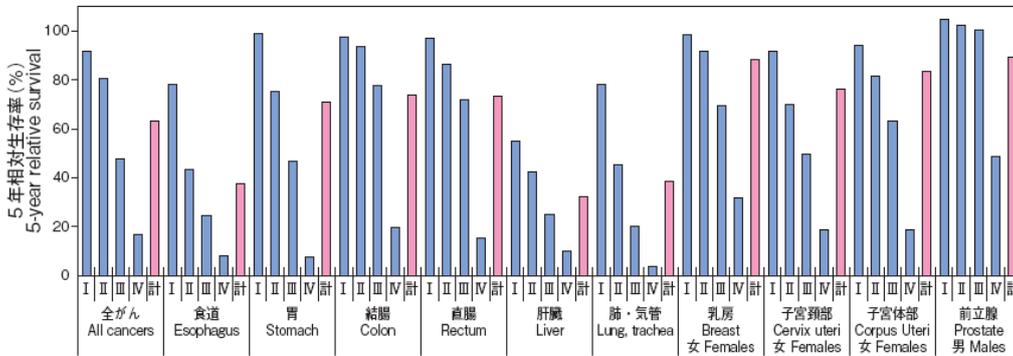


図 2(10)-2 データストレージと生細胞観察装置間におけるデータ授受の模式図

図表

(第3章 3-1)

(3) 臨床病期別5年相対生存率 男女計 (全症例)
5-year Relative Survival Rate by Clinical Stage, Both Sexes (All Cases)



(4) 臨床病期別5年相対生存率 男女計 (手術症例のみ)
5-year Relative Survival Rate by Clinical Stage, Both Sexes (Surgical Cases Only)

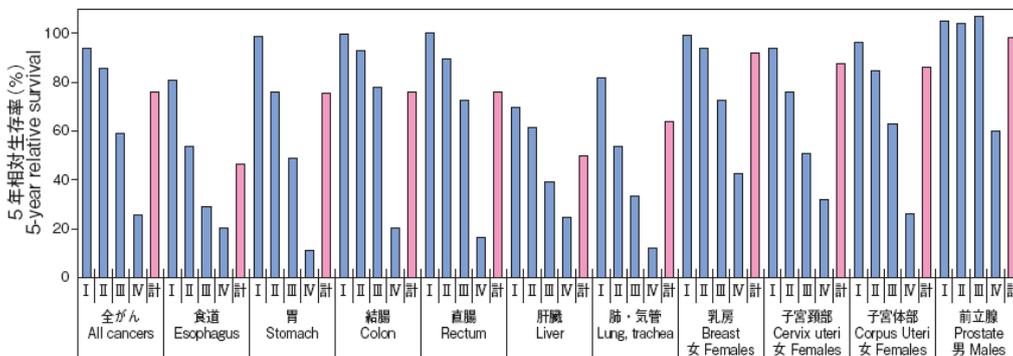


図 3(1)-1 全国がん (成人病) センター協議会加盟施設における5年生存率 (1998~2001年診断例)

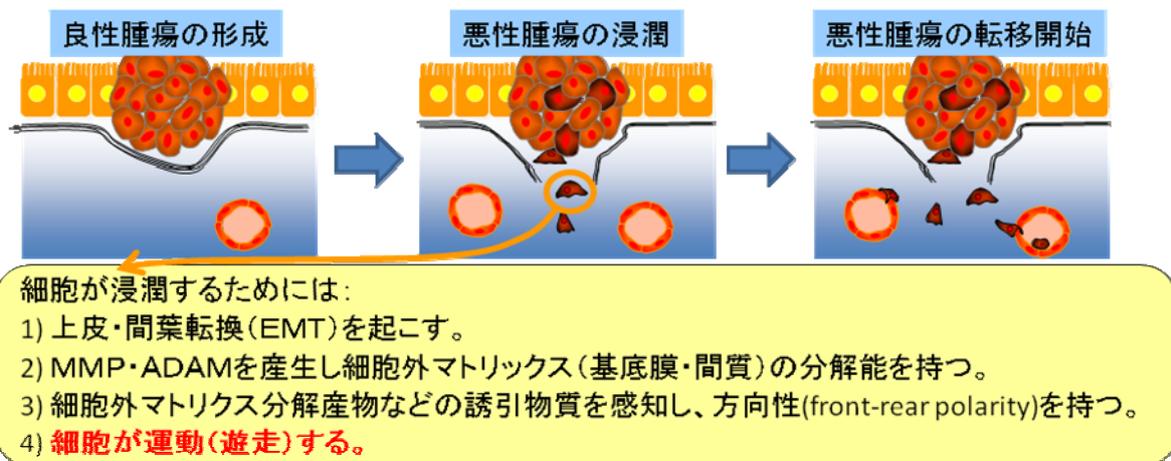


図 3(1)-2 転移のプロセス

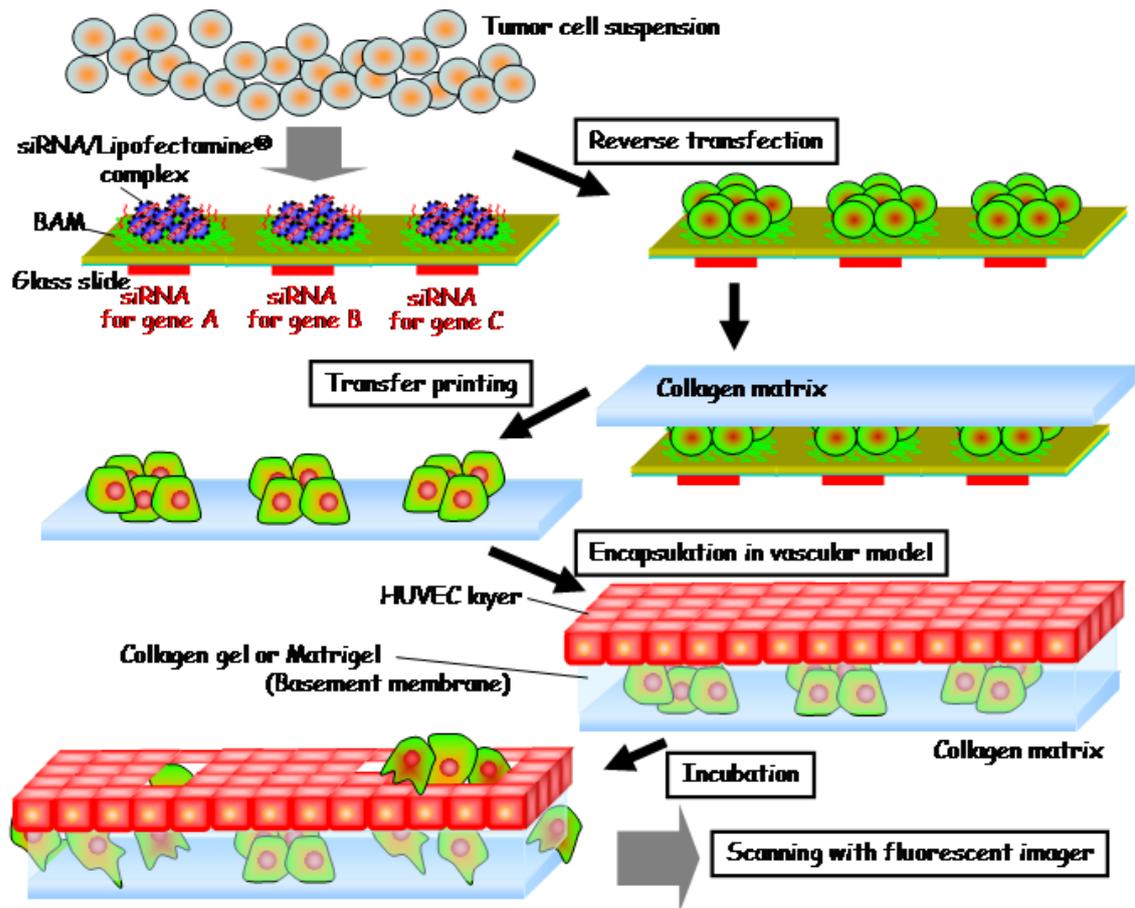


図 3(2)-1 がん細胞浸潤評価チップの概念図

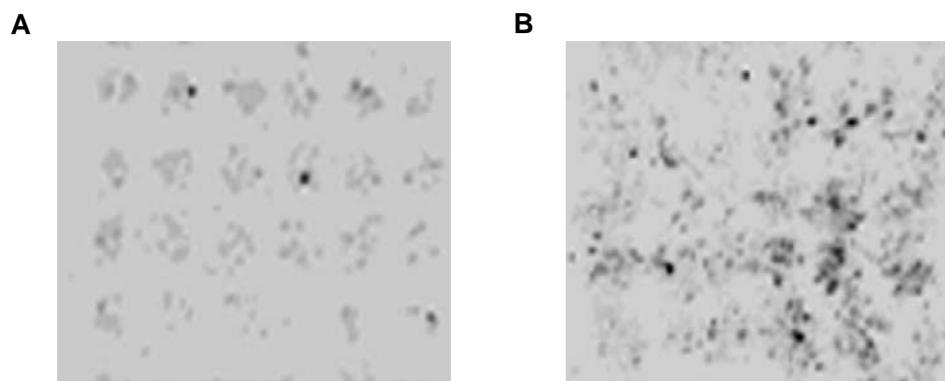


図 3(2)-2 BAM コートスライドガラス上で緑色蛍光蛋白質発現プラスミドを導入したがん細胞のコラーゲンシート上でのアレイ
(A) HeLa 細胞をアレイした際、(B) NBD-L2B 細胞をアレイした際の蛍光イメージャー画像 (488 nm 励起)。シート上に転写後、67 時間培養。

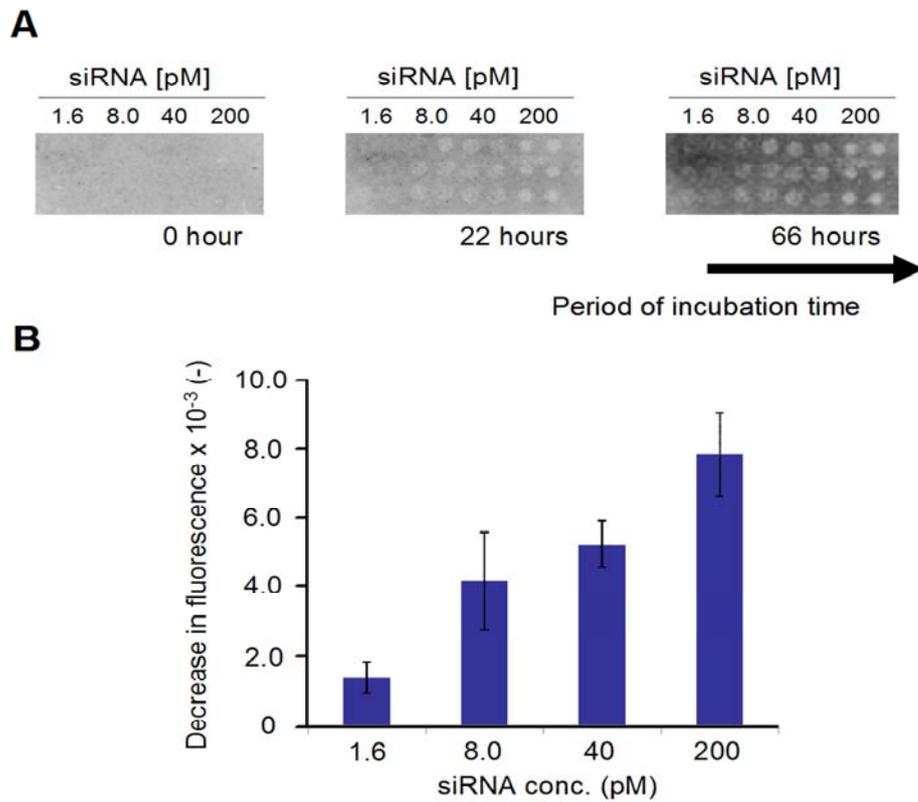


図 3(2)-3 BAM コートスライド上で anti-EGFP siRNA を導入した EGFP 恒常発現 HeLa 細胞のコラーゲンシート上でのマイクロアレイ
 (A) 蛍光イメージャー画像 (488 nm 励起)、(B) siRNA 非固定化位置に対する固定化スポット位置の蛍光減少量。siRNA 濃度は、BAM コートスライドにスプレーした siRNA 水溶液の濃度を表記。

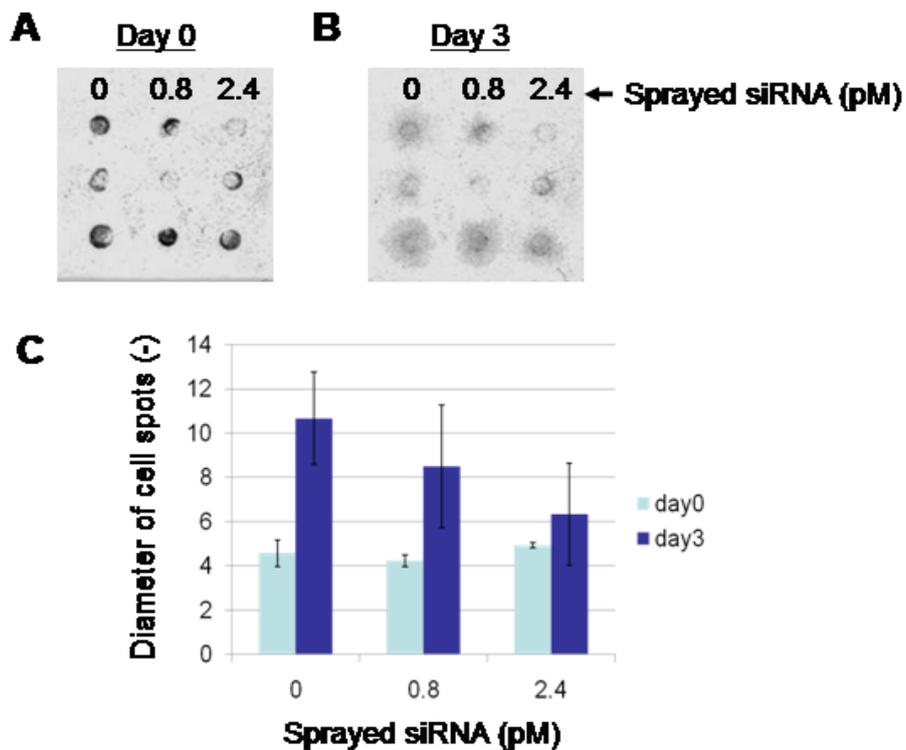


図 3(2)-4 anti-MMP14 siRNA を導入した蛍光染色 HT1080 細胞スポットを内包したコラーゲンゲルの蛍光イメージング： (A) 内包直後の蛍光イメージャー画像、(B) 3 日間培養後の蛍光イメージャー画像、(C) 蛍光スポットの直径

HT1080 細胞は DiO 染色を施して観察した。siRNA 濃度は、BAM コートスライドにスプレーした siRNA 水溶液の濃度を表記。

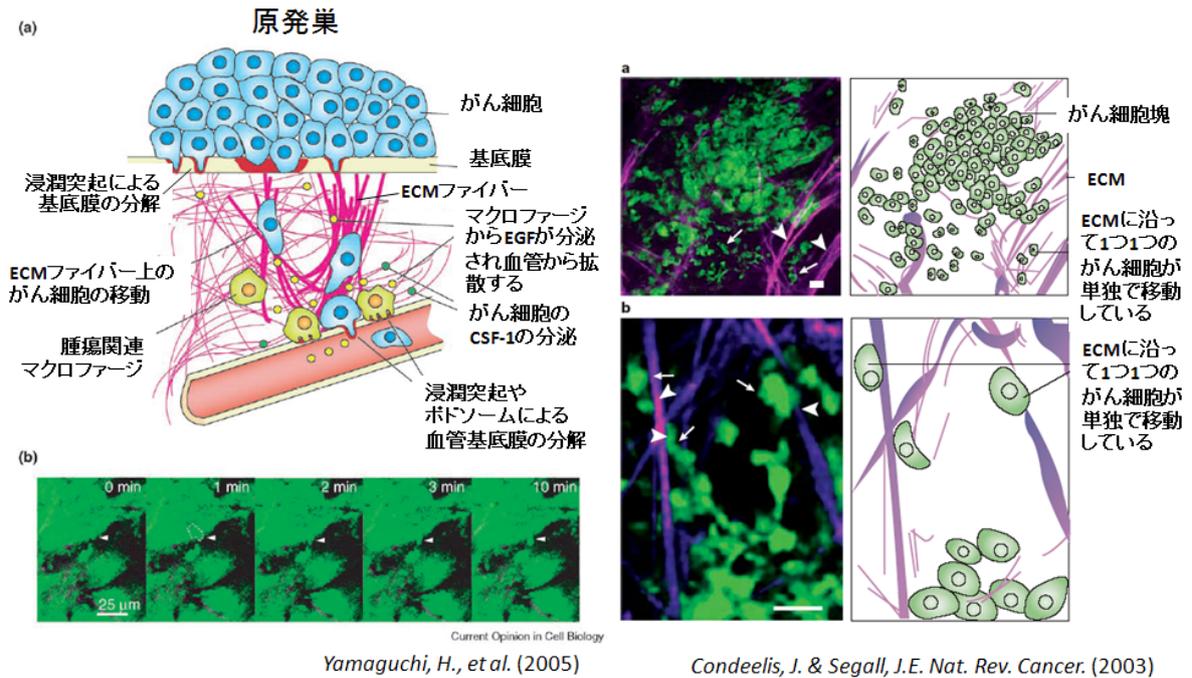


図 3(2)-5 がん組織での細胞運動

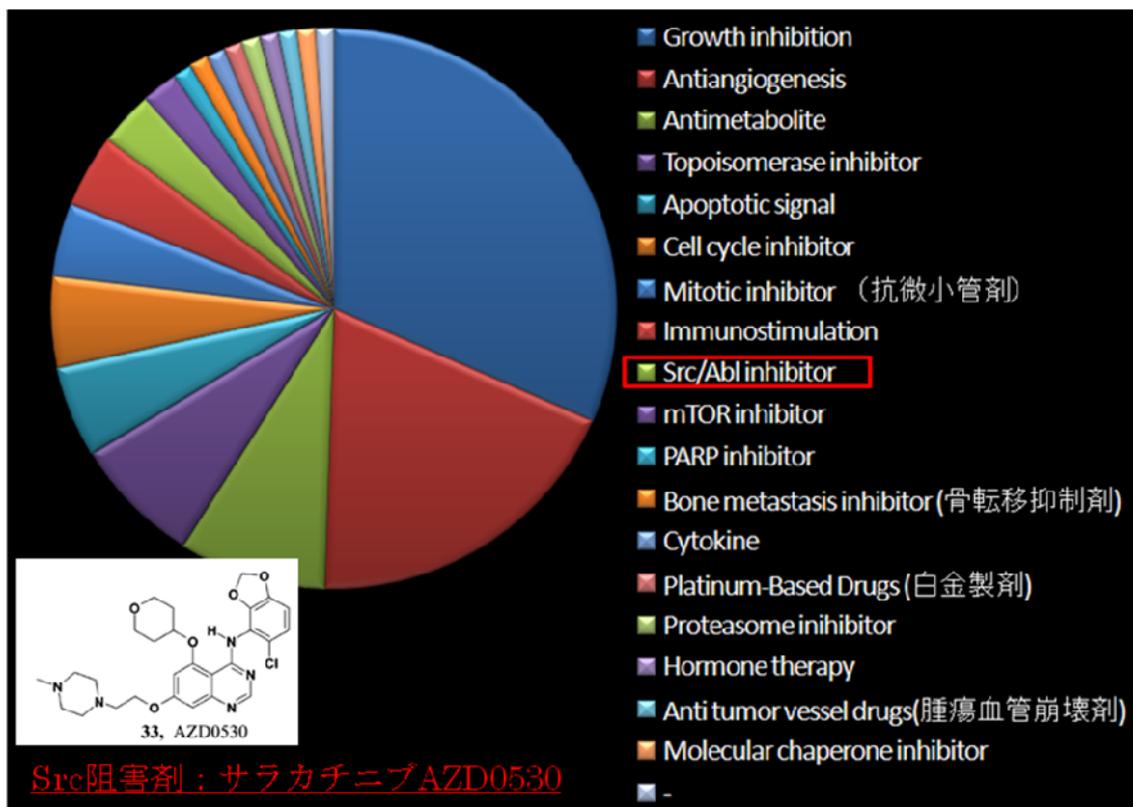


図 3(2)-5B 抗がん剤の開発状況

(A)

運動様式	細胞数	ECMの分解	細胞間接着	細胞基質間接着	転移
間葉性遊走	単独行動	○	×	○	血行性遠隔転移
集団遊走	集団行動	○	○	○	局所・リンパ節転移

→単独で運動する細胞が遠隔転移しやすい

(B)

	運動様式	簡便さ	再現性	誘引物質の評価	MMPの評価
損傷治療法	集団行動	○	△	含まない	含まない
ポイデンチャンパー法	単独行動	×	×	含む	含む (ゲル重層時)
細胞運動評価チップ	単独行動	○	○	含まない	含まない

☆単独で運動する細胞の簡便なスクリーニング手法の開発が必須

図 3(2)-6 がん細胞の遊走の特徴(A)と現行の評価方法(B)



インクジェット方式で

- ・ローダミン (赤) ラベルしたフィブロネクチン
- ・EGFP(緑) タンパク発現ベクター
- ・siRNA
- ・Lipofecatmine™2000
- ・ゼラチン

を培地に加えた溶液をスライドガラスにプリント

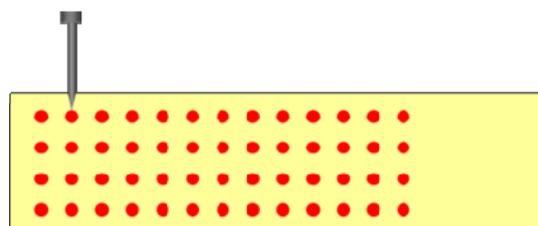


図 3(2)-7 細胞運動評価セルチップの作成

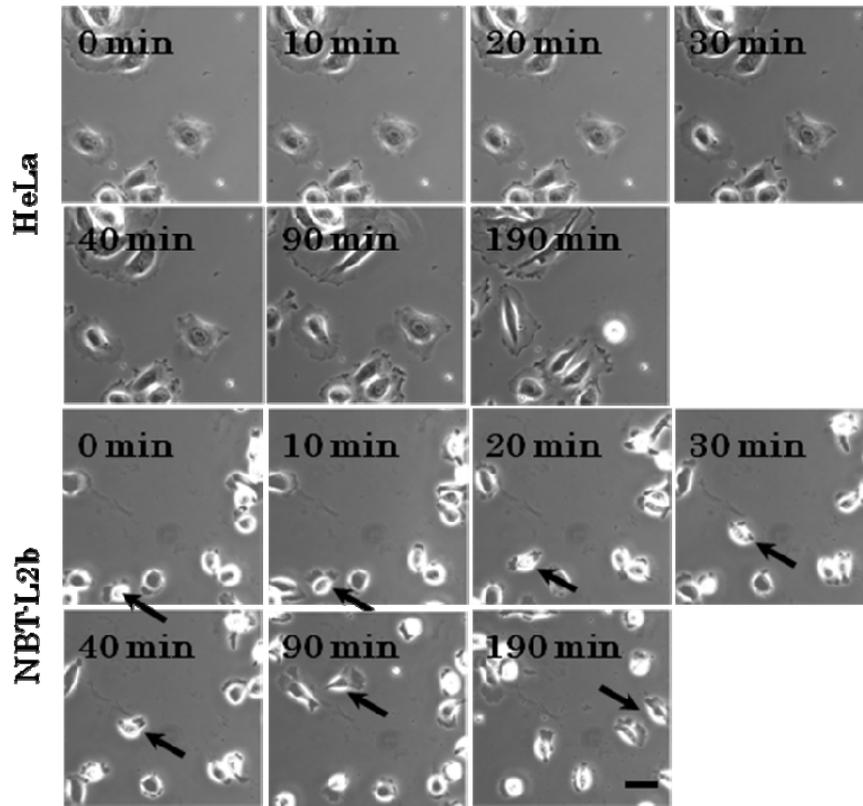
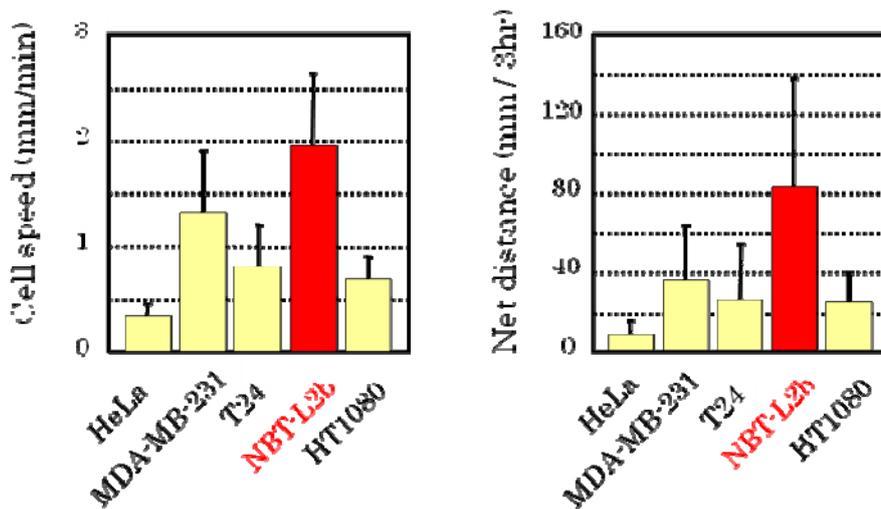


図 3(2)-8 細胞の運動能の比較



コラーゲンコートディッシュでNBT-L2bが最も速い運動性と高い直線運動性を示した。

図 3(2)-9 細胞運動評価用細胞の選定

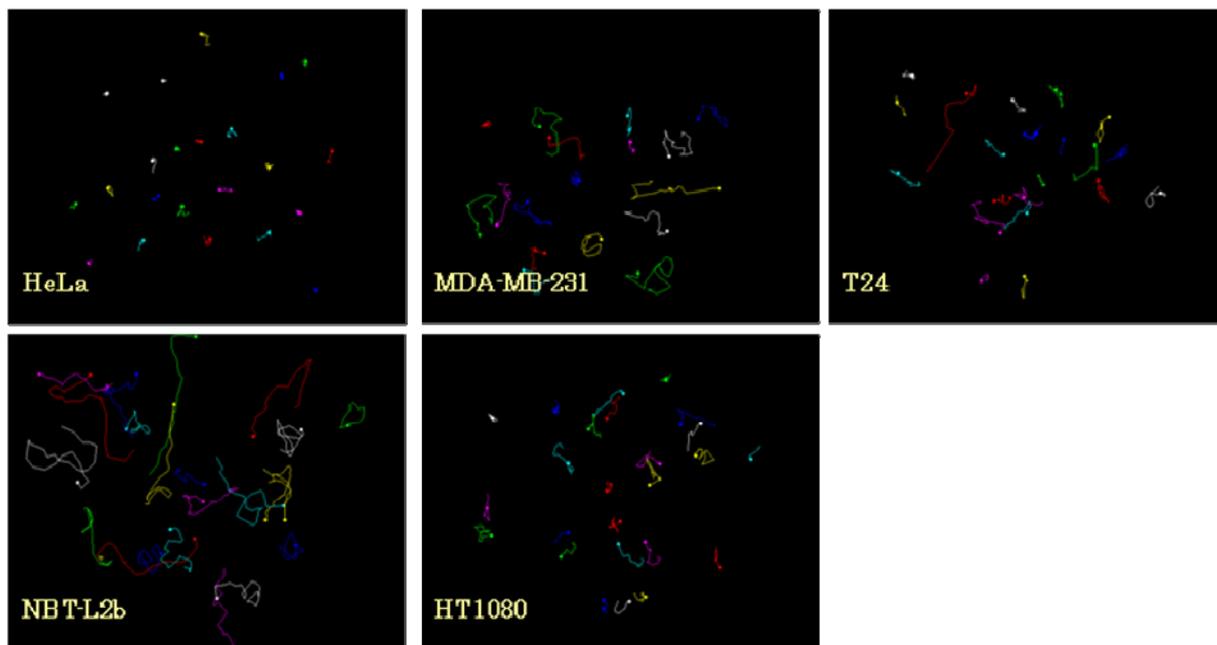
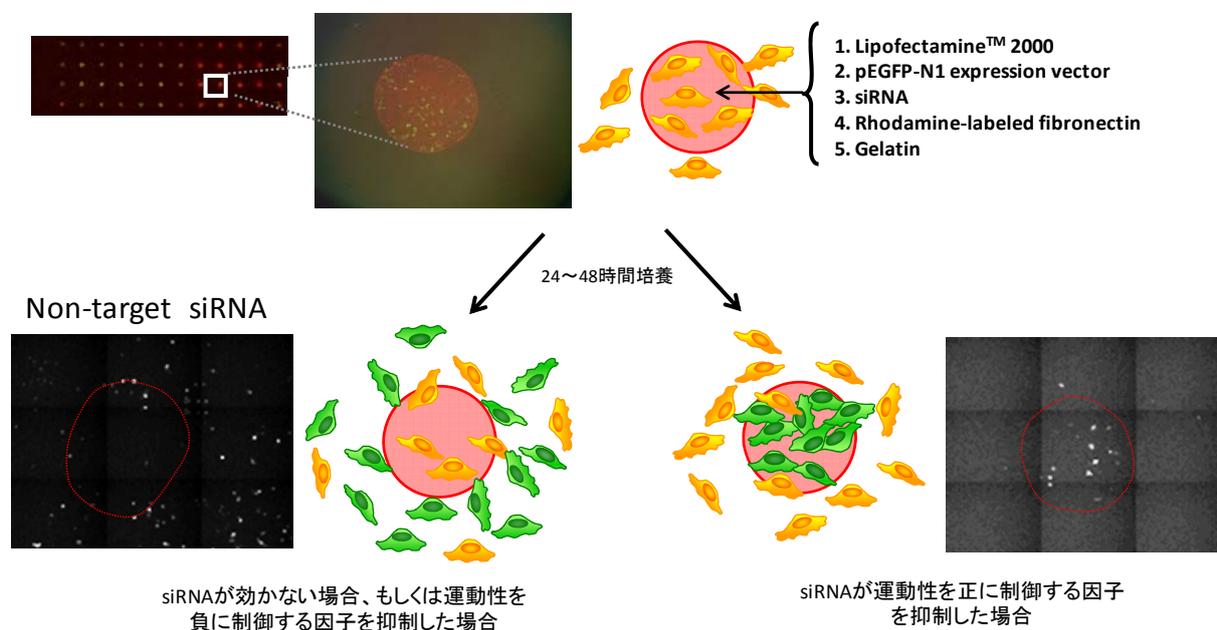


図 3(2)-10 細胞運動評価用細胞の選定



赤色蛍光内の緑色蛍光強度で簡単に運動性が評価できる

特願2007-144215, Nagasaki, R. et al., (2008) Lab Chip, 9, 1502-1506.

図 3(2)-11 細胞運動性評価チップの開発

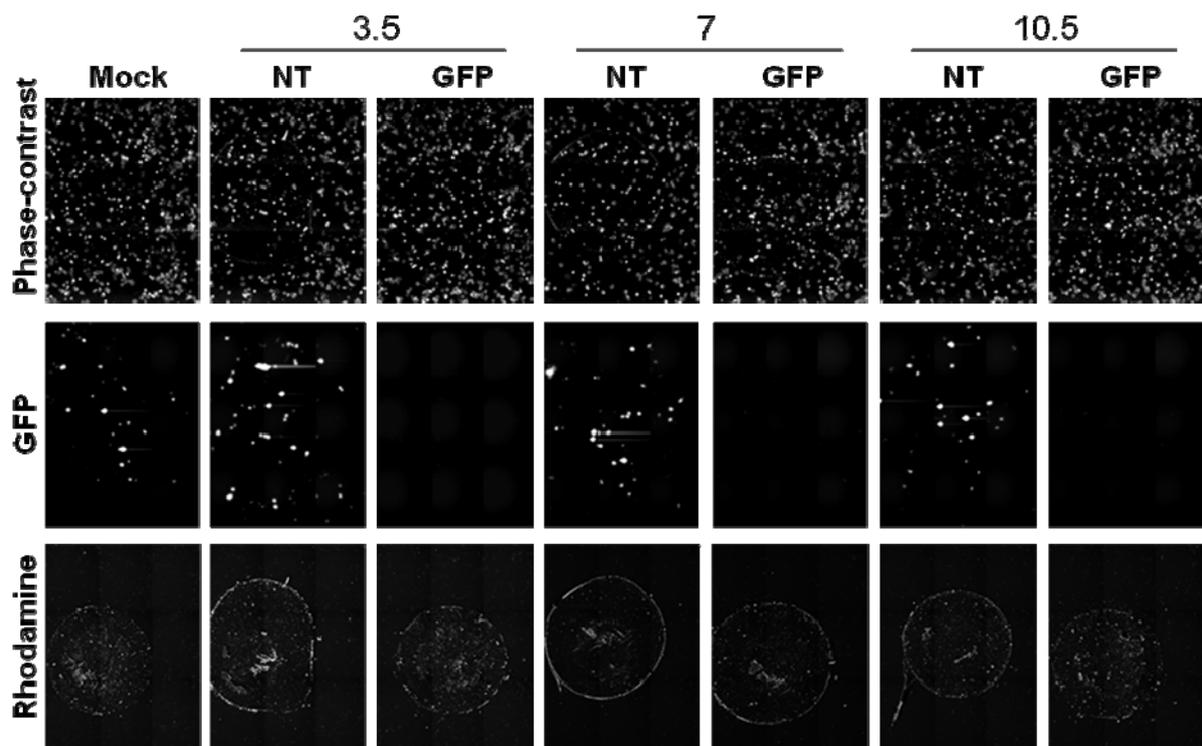


図 3(2)-12 リバーストランスフェクション条件の至適化

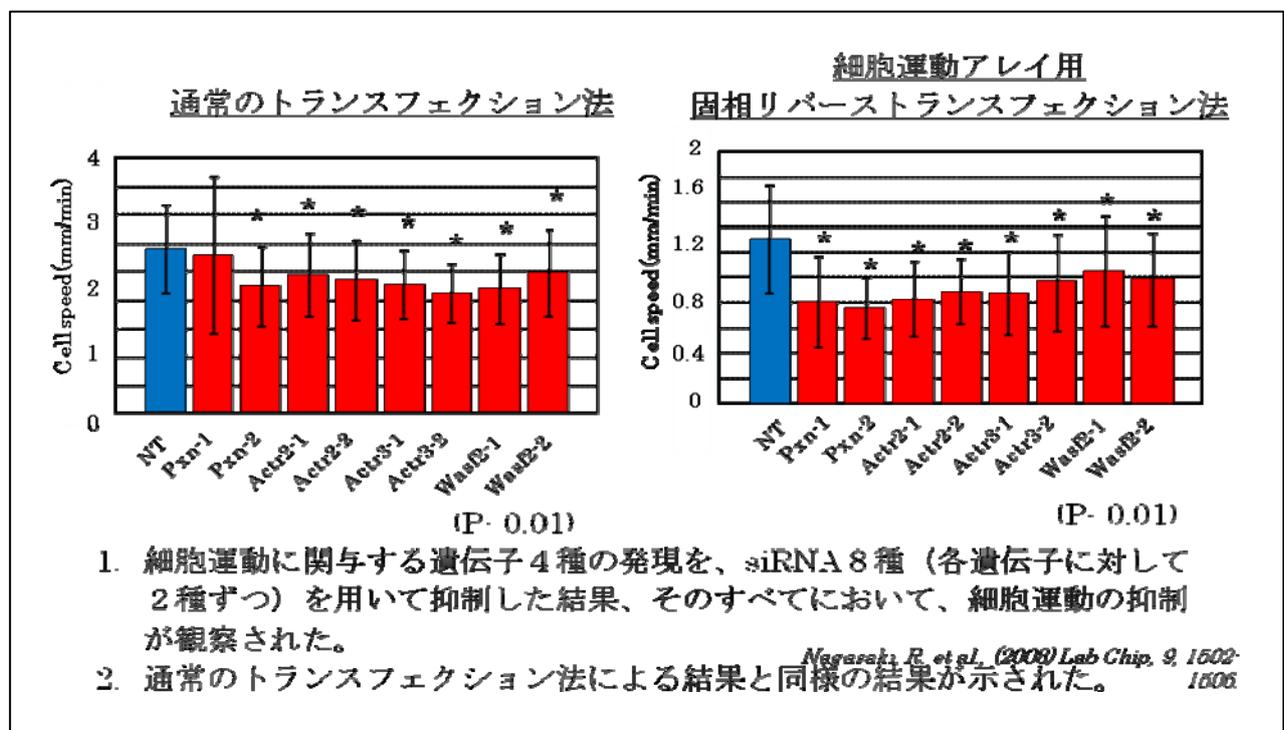


図 3(2)-13 細胞運動を抑制する siRNA を TFA で導入した際の細胞速度の比較

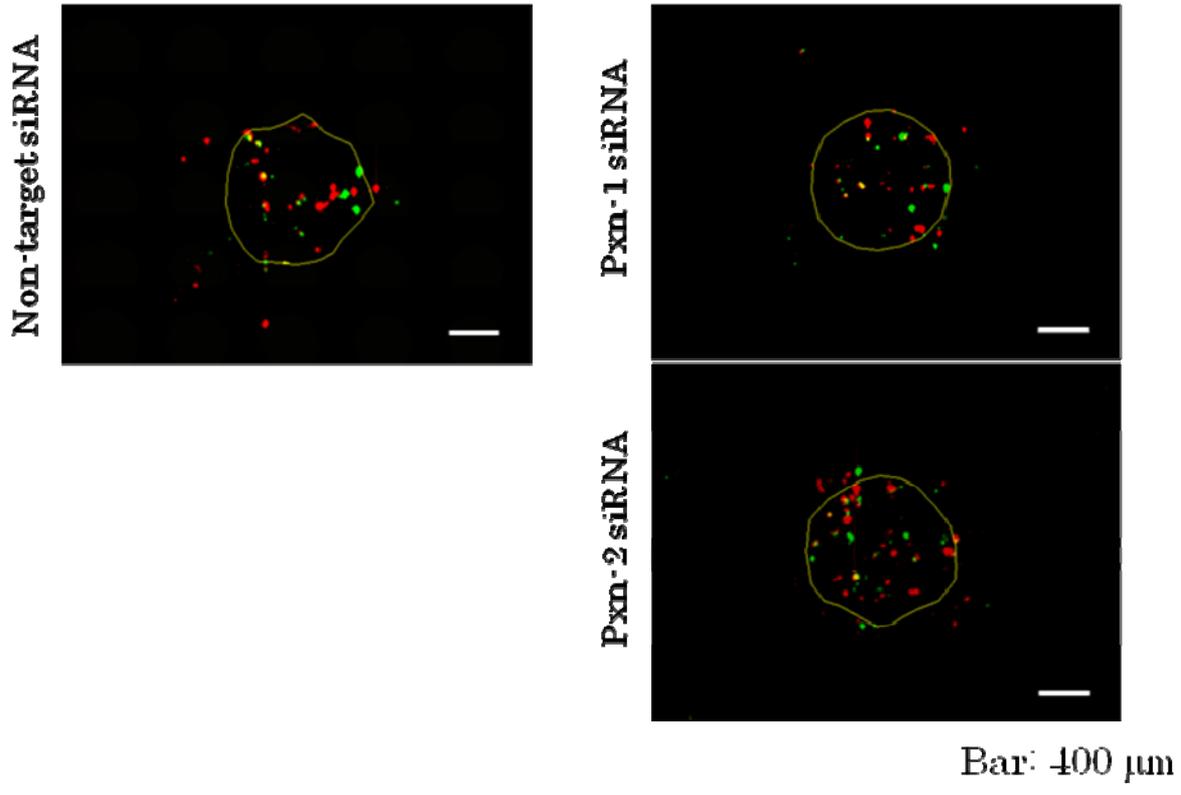


図 3(2)-14 24 時間、48 時間後の細胞移動

遺伝子名	対照	p value
01	PXN	6.7E-13
02	PXN	6.9E-09
03	PXN	1.9E-07
04	PXN	3.0E-07
05*	PXN	1.6E-06
06	PXN	5.5E-06
07	PXN	6.3E-06
08	PXN	1.0E-05
09	PXN	1.1E-05
10	PXN	2.0E-05
11	PXN	6.3E-05
12	PXN	2.0E-04
13	PXN	3.8E-04
14	PXN	5.0E-04
15	PXN	7.0E-04
16	PXN	1.4E-03
17	PXN	2.6E-03
18	PXN	2.9E-03
19	PXN	4.0E-03
20	PXN	4.0E-03
21	PXN	6.2E-03
22	PXN	7.0E-03
23	PXN	7.2E-03
24	PXN	8.1E-03
25	PXN	8.7E-03
26	PXN	8.9E-03
27	PXN	1.1E-02
28	PXN	1.2E-02
transforming growth factor, beta receptor 1(Tgfb1)	PXN	1.8E-02
29	PXN	2.1E-02
30	PXN	2.4E-02
31	PXN	2.7E-02
32	PXN	3.2E-02
33	PXN	4.1E-02
34	PXN	4.4E-02
35	PXN	5.7E-02
36	PXN	8.9E-02
37	PXN	9.0E-02
38	PXN	9.8E-02
39	NT	4.3E-06
40	NT	7.5E-06
41	NT	9.1E-06
42	NT	1.9E-04
43	NT	6.8E-04
44	NT	9.0E-04
45	NT	2.2E-02
46	NT	5.0E-02
47	NT	6.5E-02
48	NT	8.7E-02

*は標的配列 A と B とともに絞り込まれた。

図 3(2)-15 1stスクリーニングで絞り込まれた遺伝子リスト

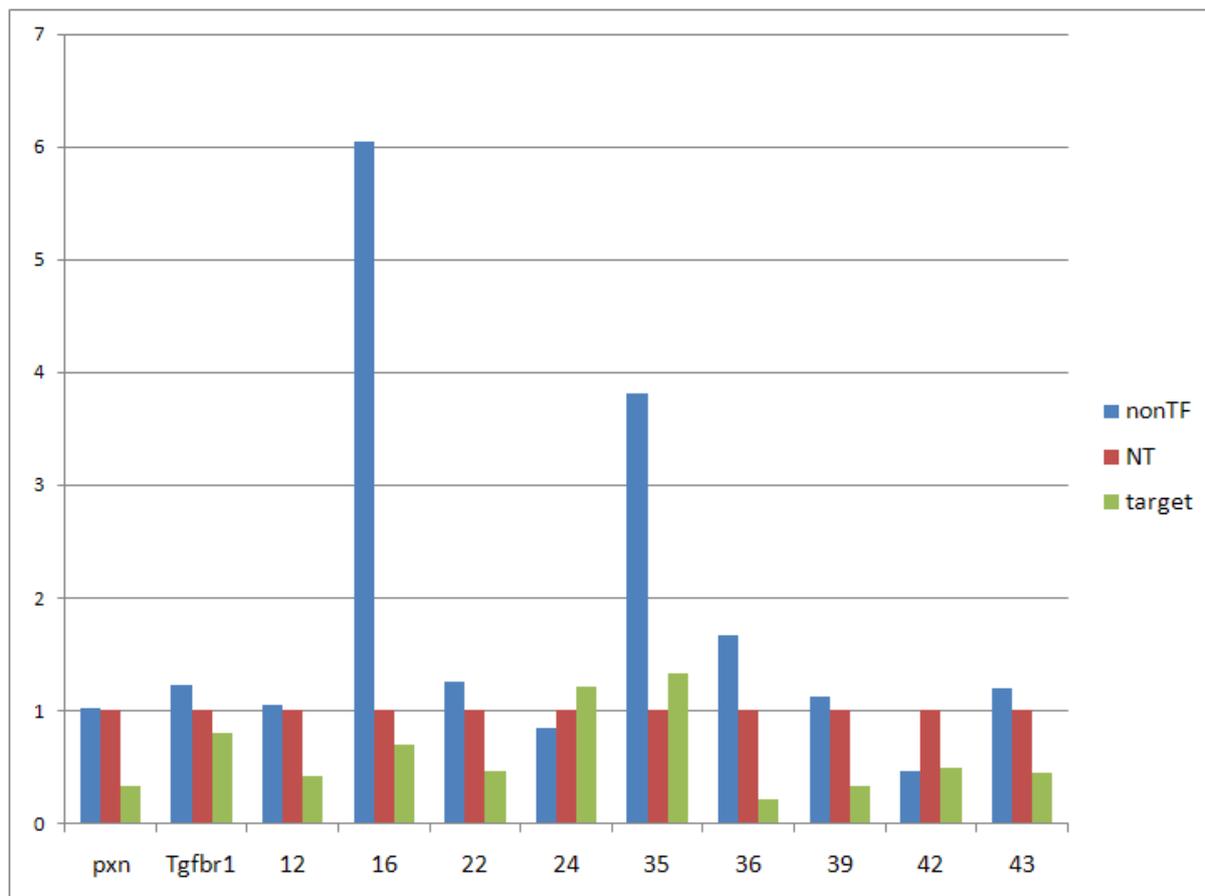


図 3(2)-16 リアルタイム PCR の結果

遺伝子名	対照	p value
12	NT	3.0E-03
16	NT	3.7E-04
22	NT	2.5E-02
transforming growth factor, beta receptor 1(Tgfbr1)	NT	4.8E-02
36	NT	6.8E-04
39	NT	8.7E-02
42	NT	4.4E-02
43	NT	1.8E-02

図 3(2)-17 2nd スクリーニングで絞り込まれた遺伝子のリスト

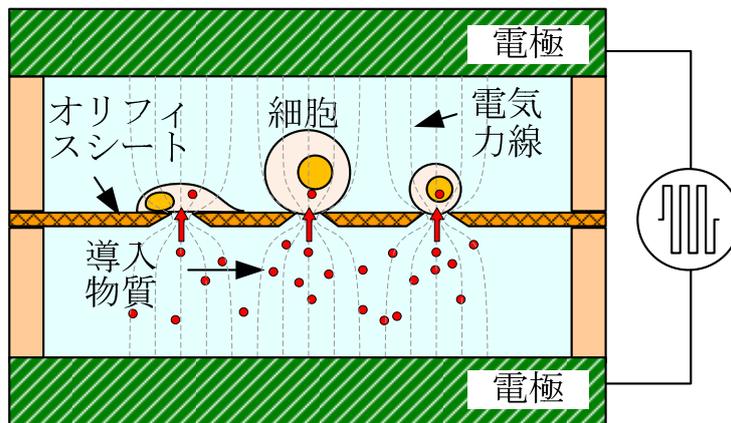


図 3(3)-1 電界集中型エレクトロポレーション装置



図 3(3)-2 HeLa 細胞に対する GFP タンパク導入
(パルス条件 : 1.5V、10ms、60 パルス)

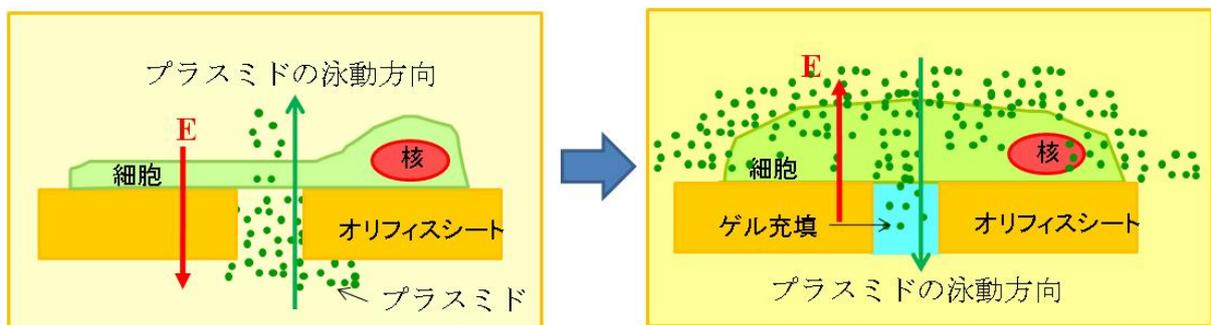


図 3(3)-3 扁平細胞に対するプラスミド導入モデルとゲル充填による基板平坦化

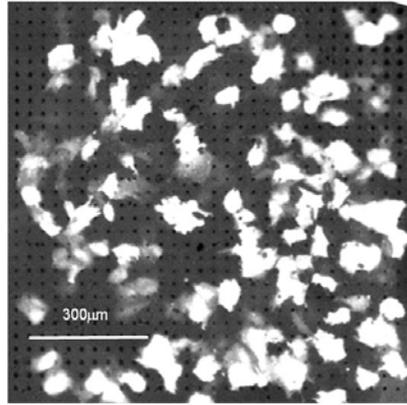


図 3(3)-4 間葉系幹細胞に対する遺伝子導入
20×20 オリフィスアレイ (パルス条件 : 4V、200ms、単発)

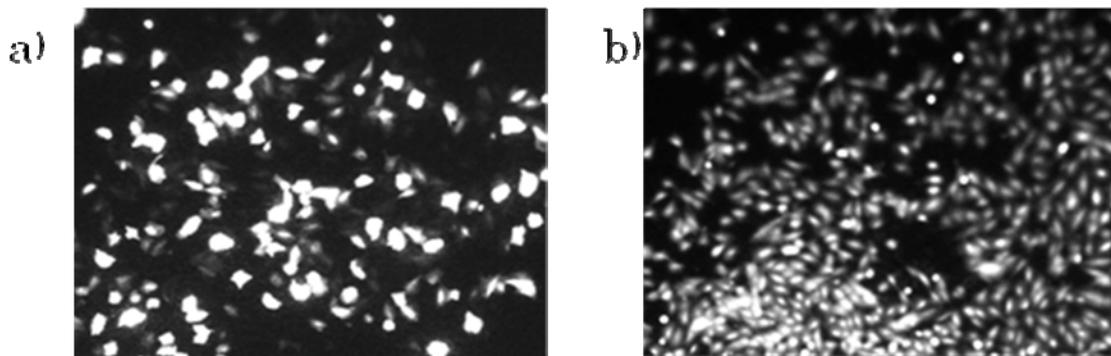


図 3(3)-5 間葉系幹細胞に対する遺伝子導入 (パルス条件 : 5V, 200ms、単発)
写真はパルス印加 5 時間後に、a)細胞内で発現した GFP からの蛍光、および、
b) その後に生死判定のためのカルセイン染色を行った時のカルセインの蛍光
(生細胞が発光)、を同じ位置で観察したものである。

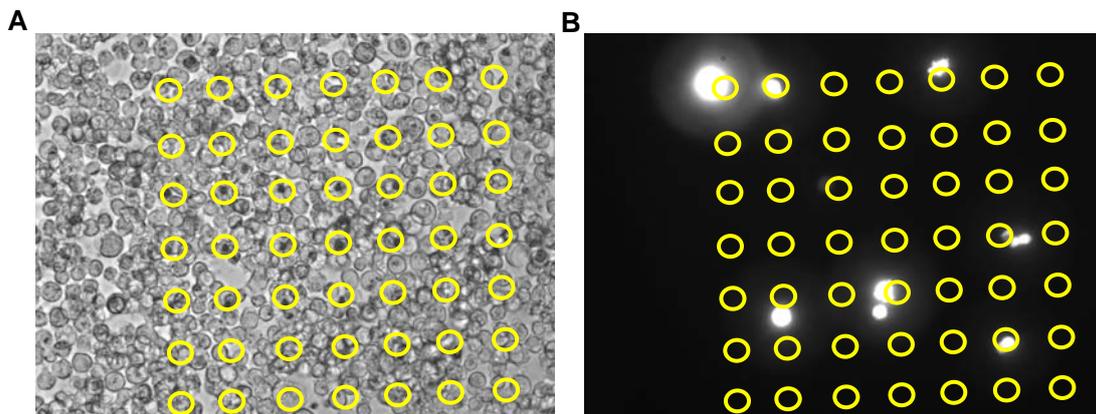


図 3(3)-6 BAM コート絶縁膜上での浮遊系 K562 細胞に対する遺伝子導入(パルス条件 : 10V, 100ms)
写真はパルス印加 24 時間後のオリフィス (○印) 近傍の細胞の顕微鏡画像。
A. 明視野像、B. 緑色蛍光像

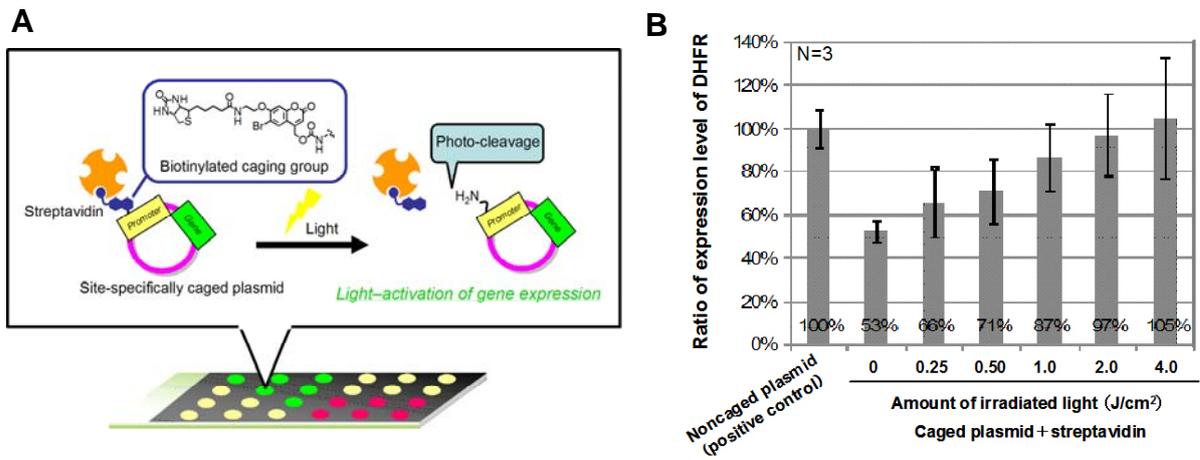


図 3(4)-1 部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドの概念図 (A) とジヒドロ葉酸還元酵素発現プラスミドをモデルとした無細胞蛋白質発現の光コントロール実験結果 (B)

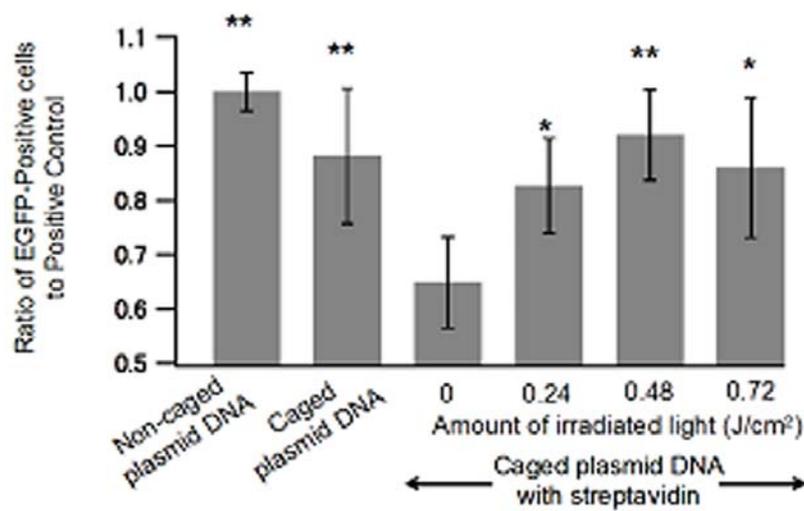


図 3(4)-2 部位特異的ビオチン化ケージング法を用いた細胞内での緑色蛍光蛋白質発現の光制御