

図表
(第4章 4-2)

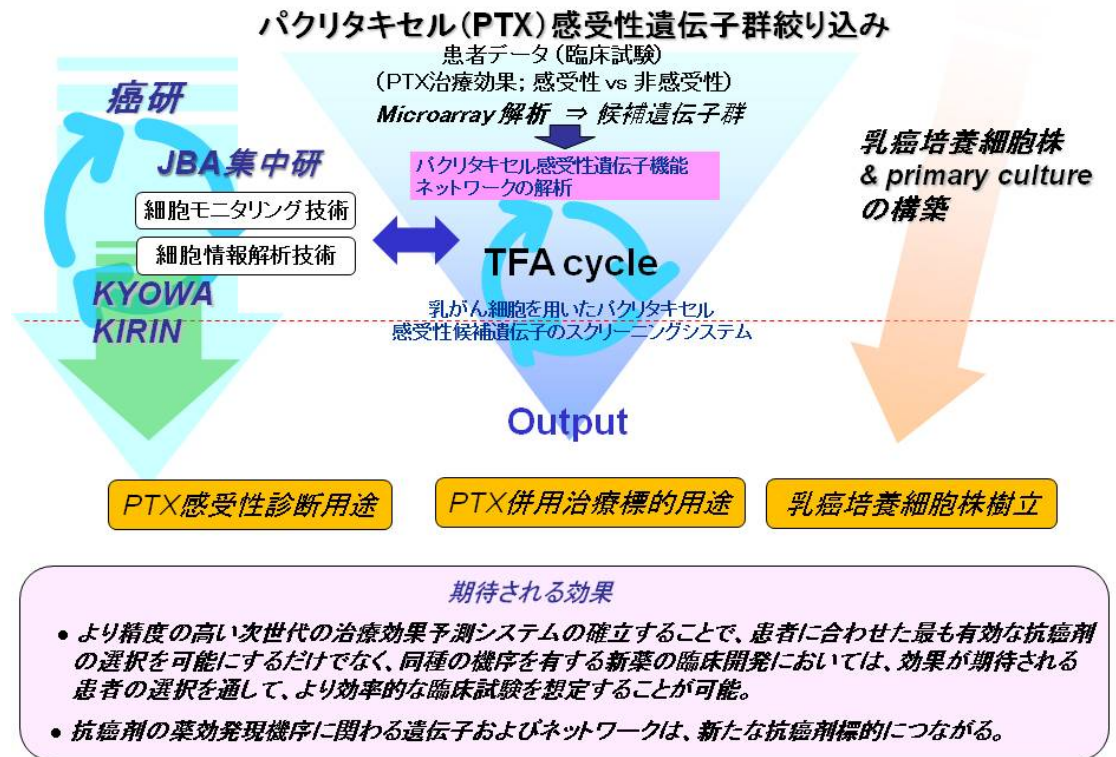


図 4(2)-1 創薬ターゲット同定技術ケーススタディー

従来の抗癌剤(化学療法)

ゲノム創薬以前の抗癌剤創薬

⇒ 殺細胞活性による化合物(=細胞毒)スクリーニング

- ◆ 代謝拮抗剤; 5FU、S1、Ara-C、Capecitabine、Gemcitabine など
- ◆ DNA作用薬; アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤 など
- ◆ 白金製剤; シスプラチン、カルボプラチン、オキザリプラチン など
- ◆ 微小管作用薬(細胞分裂阻害); ピンカアルカロイド、**タキサン**、エポシロン など

【臨床効果】腫瘍縮小

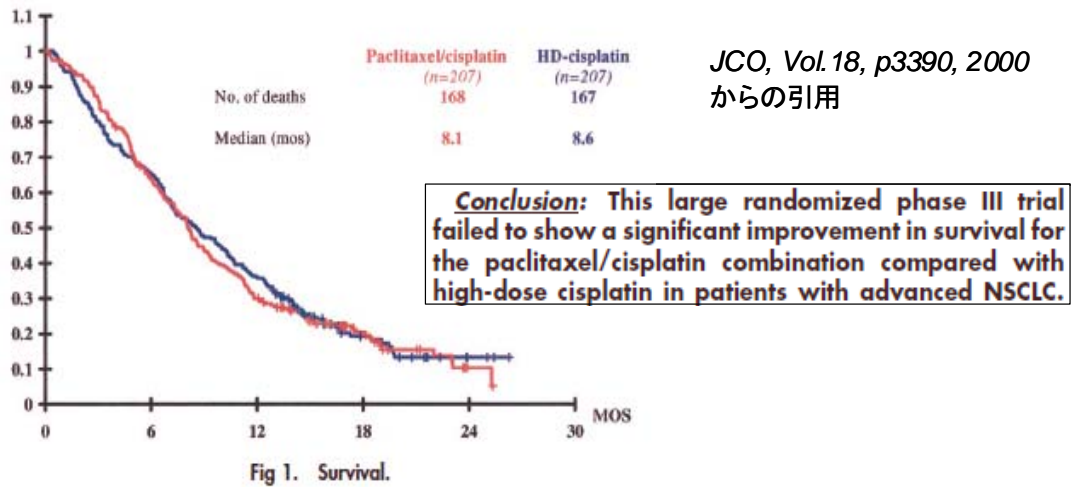
がん細胞の増殖を選択的に阻害するメカニズムでは無い

【課題】

- ・ 強い副作用
- ・ 単剤での効果には限界、薬剤耐性 ⇒ **多剤併用療法**

図 4(2)-2 ゲノム創薬以前の抗がん剤創薬

Phase III Comparative Study of High-Dose Cisplatin Versus a Combination of Paclitaxel and Cisplatin in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer



大規模臨床試験で併用療法のメリットが示せなかったケース
⇒ 化学療法剤カクテル療法開発の限界？

図 4(2)-3 20 世紀の化学療法併用開発の一例

ゲノム創薬・分子標的薬

がん細胞で発現している標的分子、
がんの増殖、生存に関与する遺伝子産物
(がん遺伝子やそのシグナル関連因子)を標的とした薬剤開発

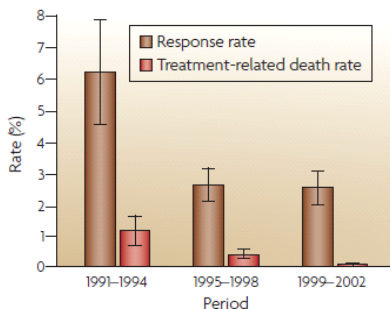
- ◆ がん細胞表面抗原や分泌因子中和を標的とする抗体医薬

Rituxan(CD20)、Herceptin(Her2)、Erbix(EGFR)、Avastin(VEGF)

- ◆ 標的蛋白への結合、酵素アッセイ、
標的分子発現細胞に対する選択的抗細胞などを指標にした
High Throughput Screening 等による低分子医薬開発(主
にキナーゼ阻害剤)

Gleevec(Bcr-Abl)、Tarceva(EGFR)、Iressa(EGFR)、Tykerb(Her2)、
Nexavar(KDR マルチキナーゼ)、Sutent (KDRマルチキナーゼ)
Velcade(proteasome)、Torisel(mTOR)

図 4(2)-4 ゲノム創薬、分子標的創薬時代の抗がん剤



NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
VOLUME 6 | FEBRUARY 2007

Phase I (単剤)での
毒性軽減しているが
腫瘍縮小の薬効は弱い

	標準治療として用いられている化学療法	併用される分子標的薬
大腸癌	5FU Capecitabine Oxaliplatin	Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Panitumumab EGFR
乳癌	Docetaxel, Paclitaxel Doxorubicin, Epirubicin Cyclophosphamide Fluorouracil Gemcitabine Capecitabine Vinorelbine	Trastuzumab Her2 Lapatinib Her2
非小細胞肺癌	Cisplatin, Carboplatin Vinorelbine Etoposide Docetaxel, Paclitaxel Gemcitabine Vinblastine Pemetrexed Irinotecan Ifosfamide Mitomycin	Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Erlotinib EGFR

NCCNガイドラインより抜粋

- ✓ 単剤での効果には限界
- ✓ 最終的には既存薬との併用で使われるケースが多い
- ✓ 分子標的薬どうしの併用も今後の課題

図 4(2)-5 分子標的薬と既存抗がん剤併用の現状

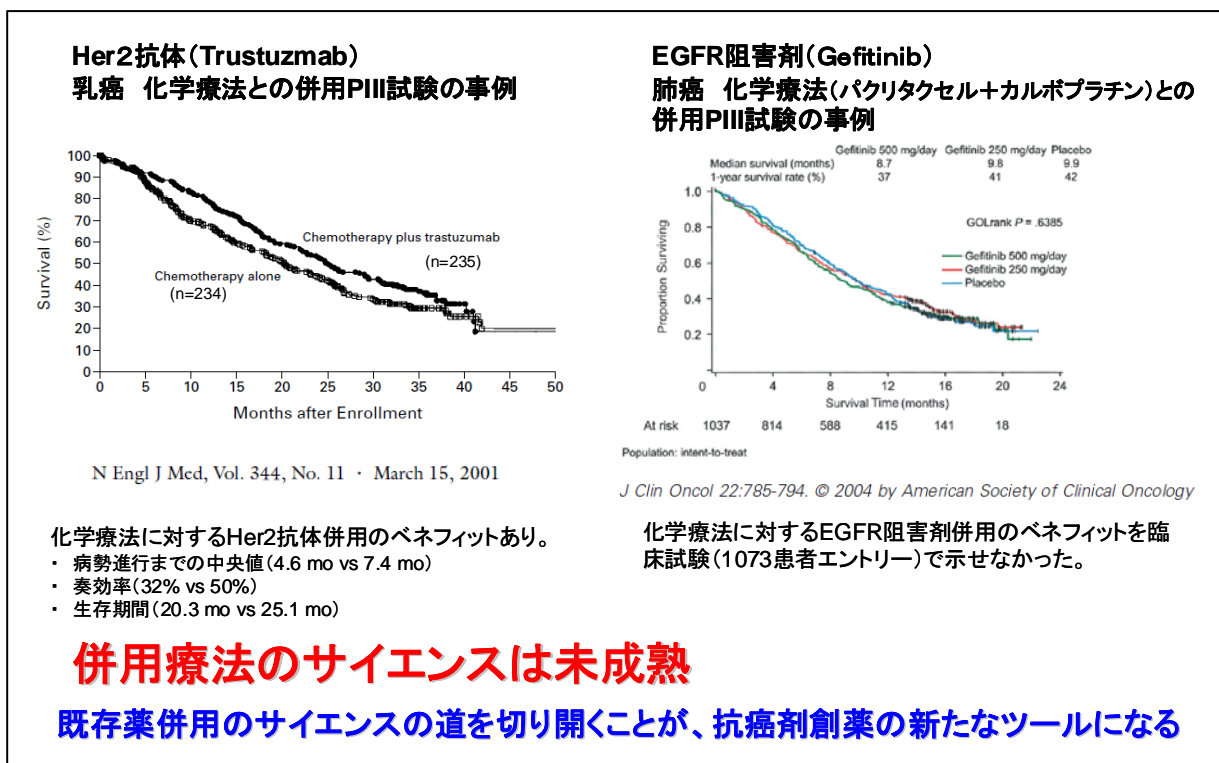
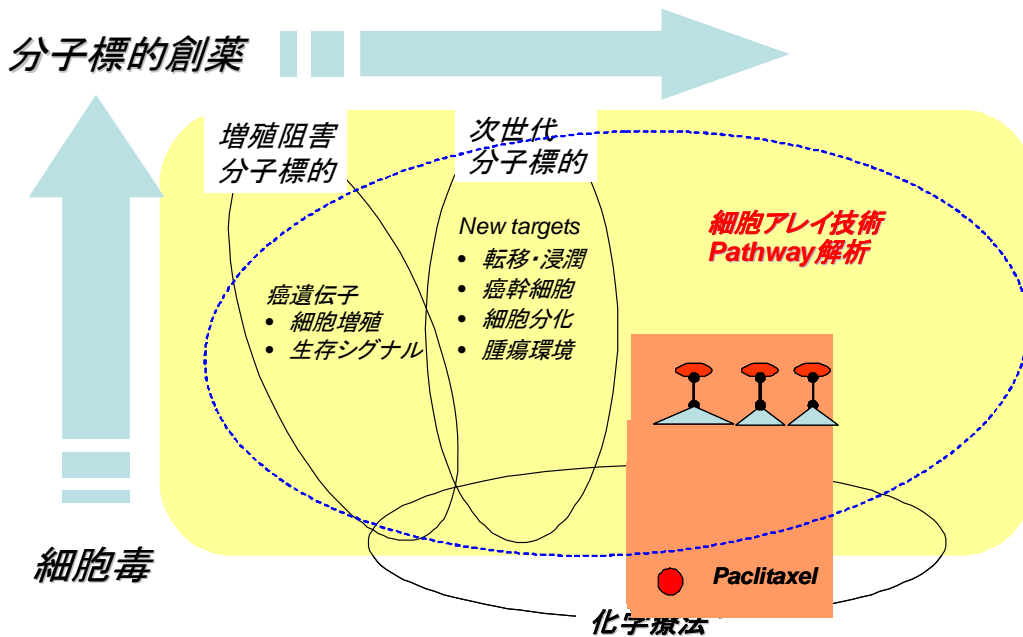


図 4(2)-6 分子標的薬と既存抗がん剤併用療法開発の現状



既存化学療法 (Paclitaxel) 応答性に関与する新たな pathway からの展開可能性
 ⇒ 患者選択、併用のラショナル

図 4(2)-7 抗がん剤創薬から見た本プロジェクトの位置付け

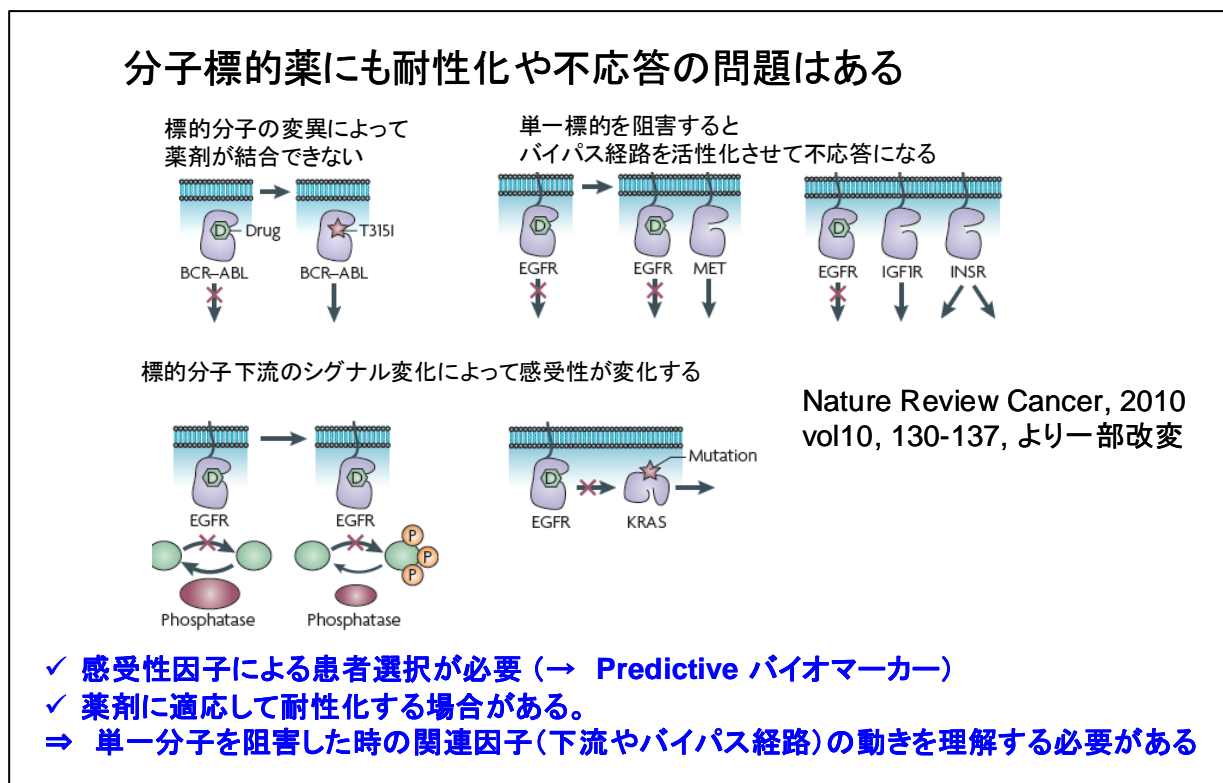


図 4(2)-8 分子標的療法に対する不応答、薬剤耐性

(パクリタキセル感受性遺伝子機能ネットワークの解析)

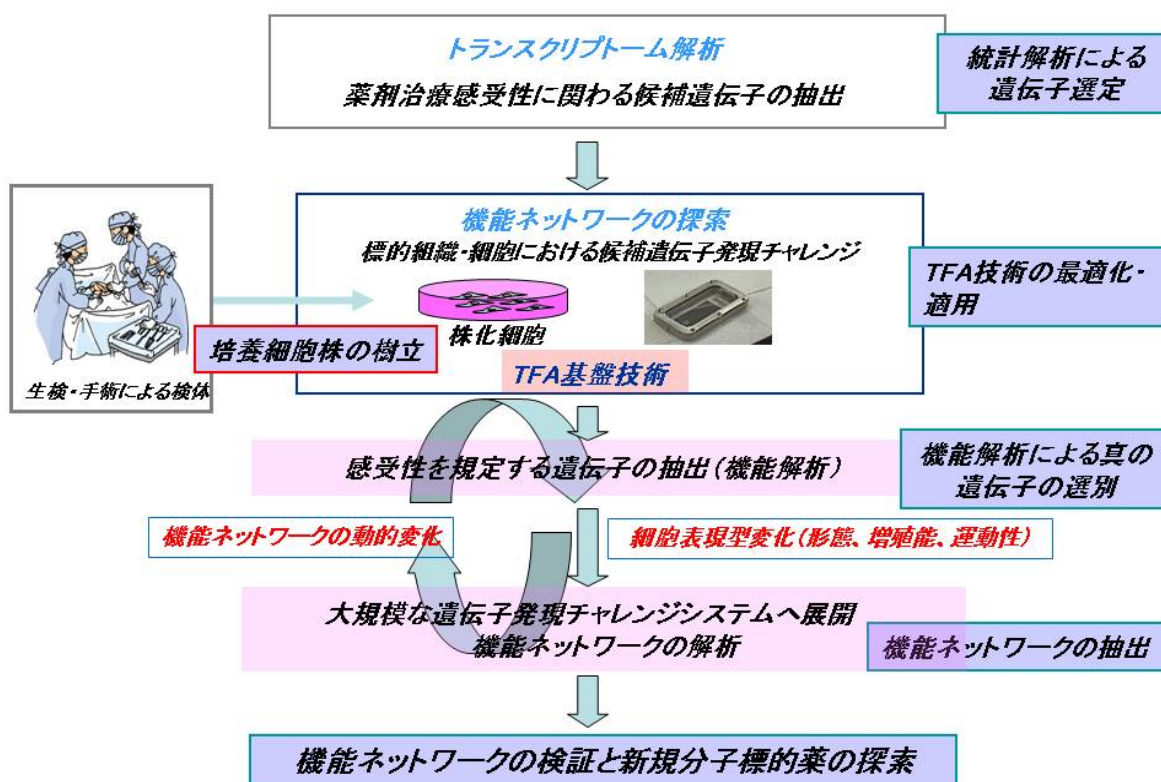


図 4(2)-9 セルアレイを用いた機能ネットワーク検証システム

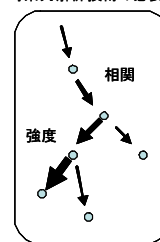
既存薬の効果を増強する併用分子標的創薬への試み

- 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は重要な課題。

薬剤併用時の細胞内の動的なパスウェイに作用するものを見出す方法論の確立

- 併用薬の最適な組み合わせのサイエンスは未成熟の領域。
- 患者組織や細胞株のスナップショット的な投与前遺伝子解析では、薬剤併用時の細胞内シグナルの動き(動的プロファイル)が加味されていない。
- 細胞の中で起こる併用薬剤に応答する分子間の相互関係や、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や方法論が必要。

時系列解析技術の必要性



単純なネットワーク議論ではなく、細胞内の分子状態を統合的に表現する方法を探索する。細胞の物理的予測評価技術への発展を将来的に引き続き検討する。



多次元的な解析による高次元細胞像の理解

N次元要素(遺伝子、パスウェイ、時間)からなる状態

細胞機能解析、細胞時系列解析を総合的に組み合わせた日本発の新たな創薬アプローチ

図 4(2)-10 本研究の意義とプロジェクト内での位置付け

対象

◆ 選択条件

- 病理学的に浸潤癌であることが確認された浸潤径 3 cm以上の Stage II a～III b原発性乳癌
- ≤ 70 才、PS: 0～1
- 骨髄・肝・腎 機能が十分保たれている
- (WBC≥4000、Plat. ≥10万、Hb≥10、GOT/GPT<60/70)
- その他重篤な合併症を認めない
- 文書で同意が得られている

◆ 除外条件

- 前治療歴がある
- 妊娠の希望がある

治療法

パクリタキセル単剤： 80m g / m² の週1回、12回投与（3ヶ月）

図 4(2)-11 術前化学療法（臨床試験）の対象症例

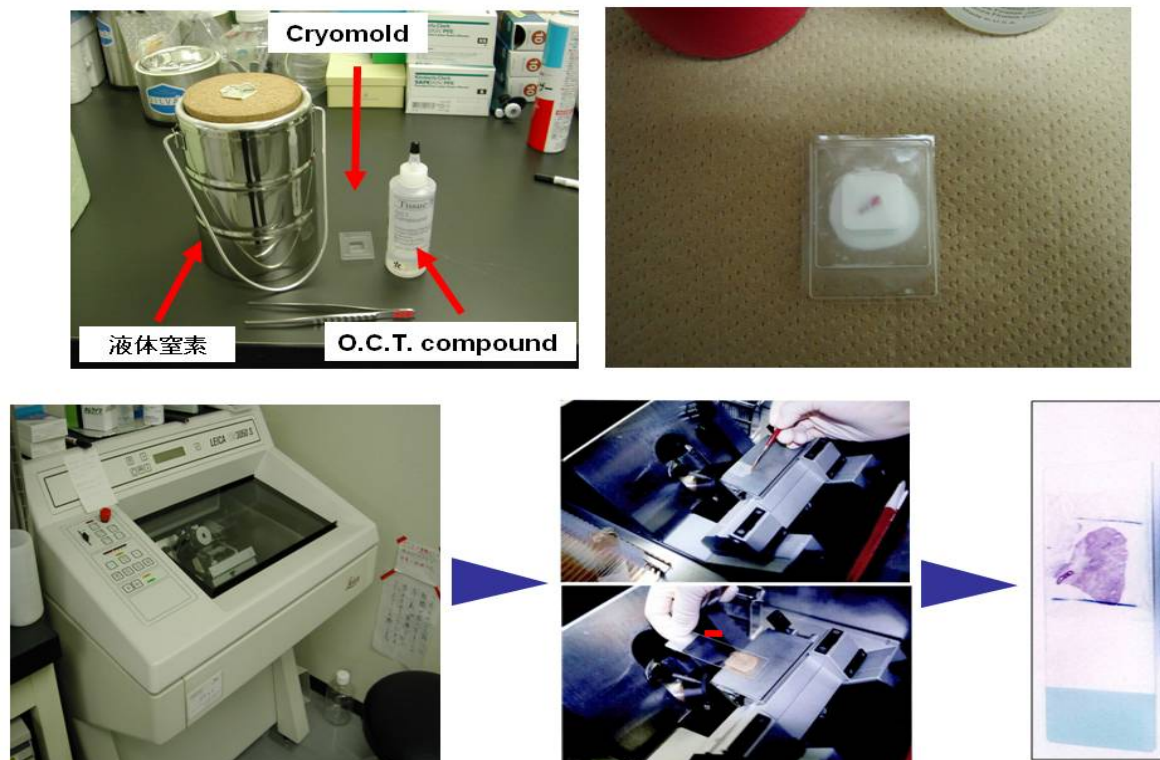
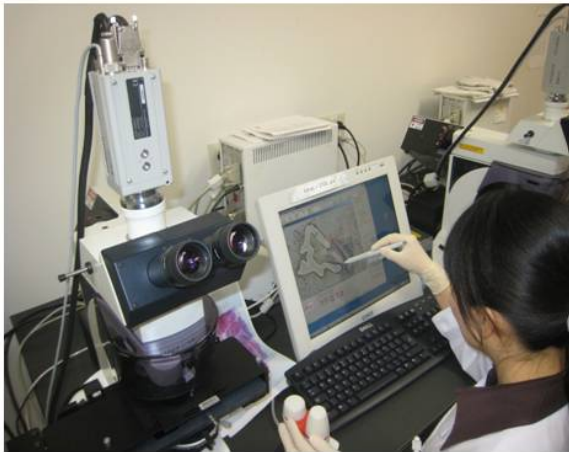
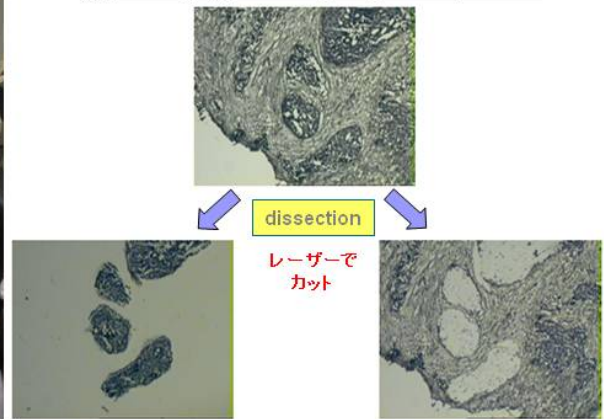


図 4(2)-12 採取した組織の包埋と薄切

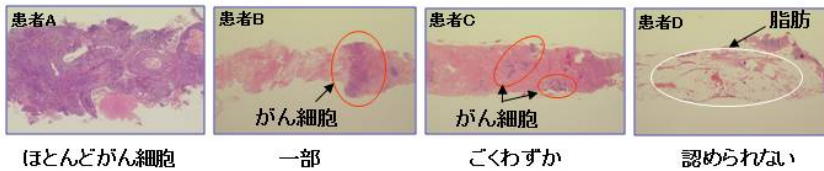


乳がん細胞のマイクロダイゼクション



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ので、間質を避け**選択的にがん組織を採取** マイクロアレイによる発現解析にはおおよそ一万個の細胞が必要

乳がん患者から針生検(12G)で採取された組織



がん細胞の含まれる割合は大きく違う

図 4(2)-13 Laser beam Microdissection によるがん細胞の採取

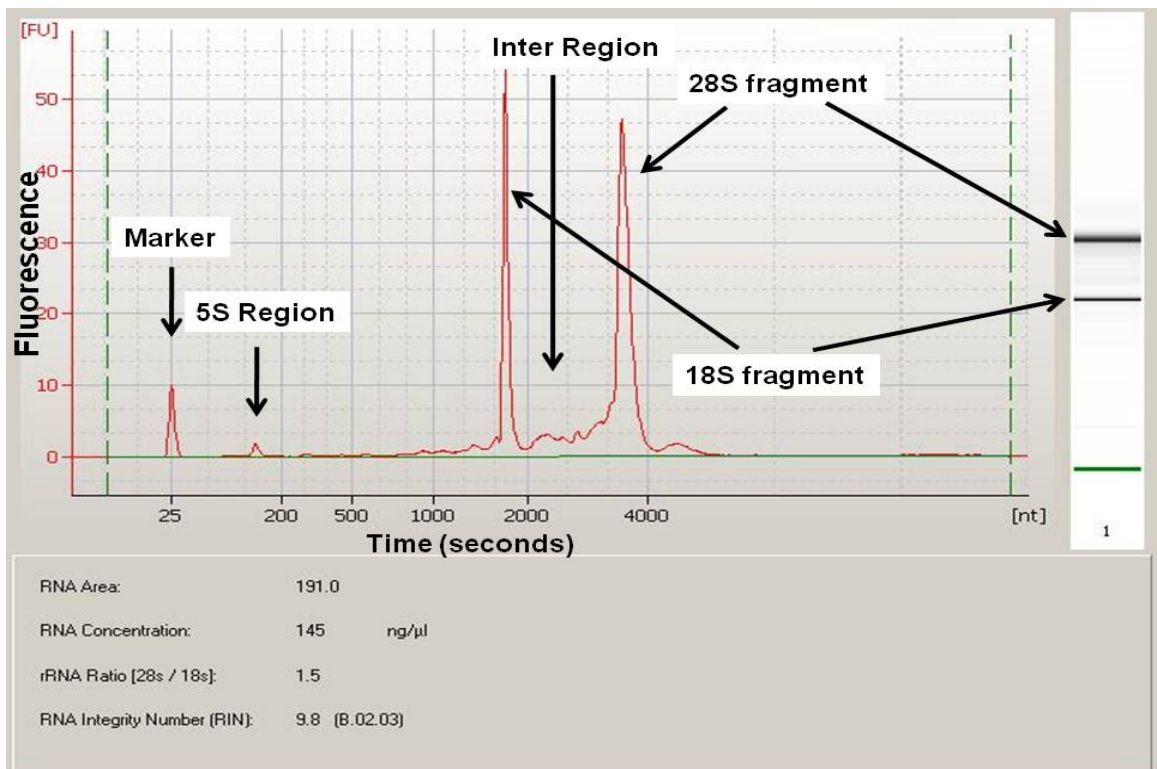


図 4(2)-14 バイオアナライザーによる RNA の質の評価

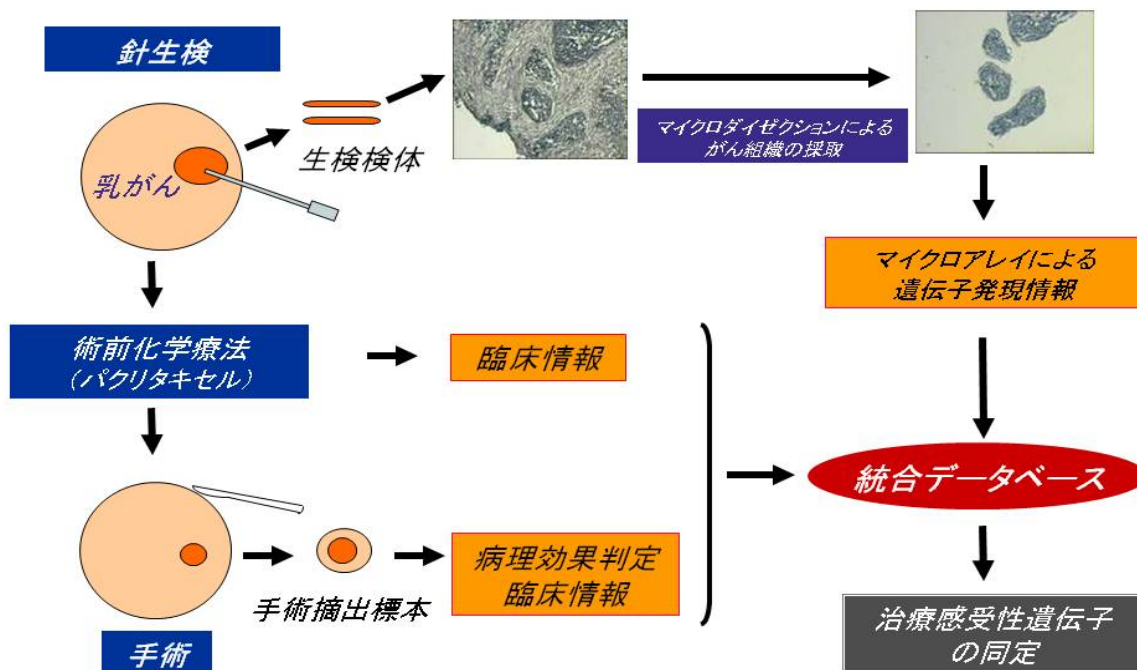


図 4(2)-15 乳がん術前抗がん剤感受性予測に関する臨床試験

パクリタキセルの治療効果判定結果

病理効果

無効群			有効群		計
0	1a	1b	2	3	
7	15	6	11	1	40

Grade0 = 無効

Grade1a = 約1/3未満の癌細胞に高度の変化、

Grade1b = 約1/3～2/3未満の癌細胞に高度の変化

Grade2 = 約2/3以上の癌細胞に高度の変化

Grade3 = 全ての癌細胞が壊死、あるいは消失

図 4(2)-16 術前パクリタキセル治療による病理学的効果判定

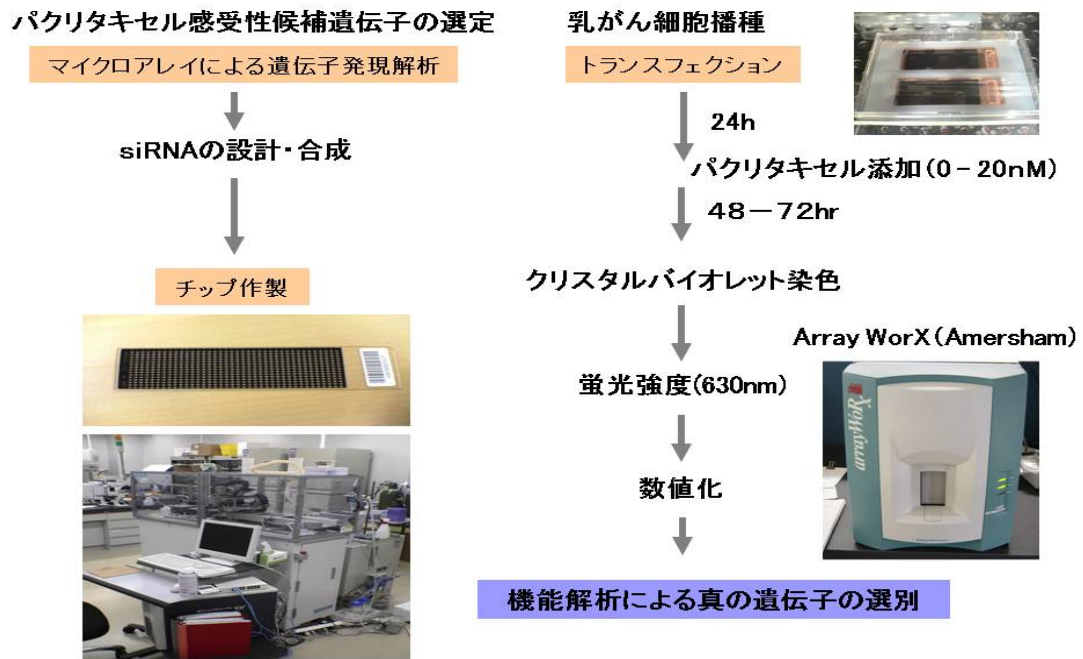


図 4(2)-17 乳がん細胞を用いた抗がん剤感受性遺伝子の発現チャレンジシステム

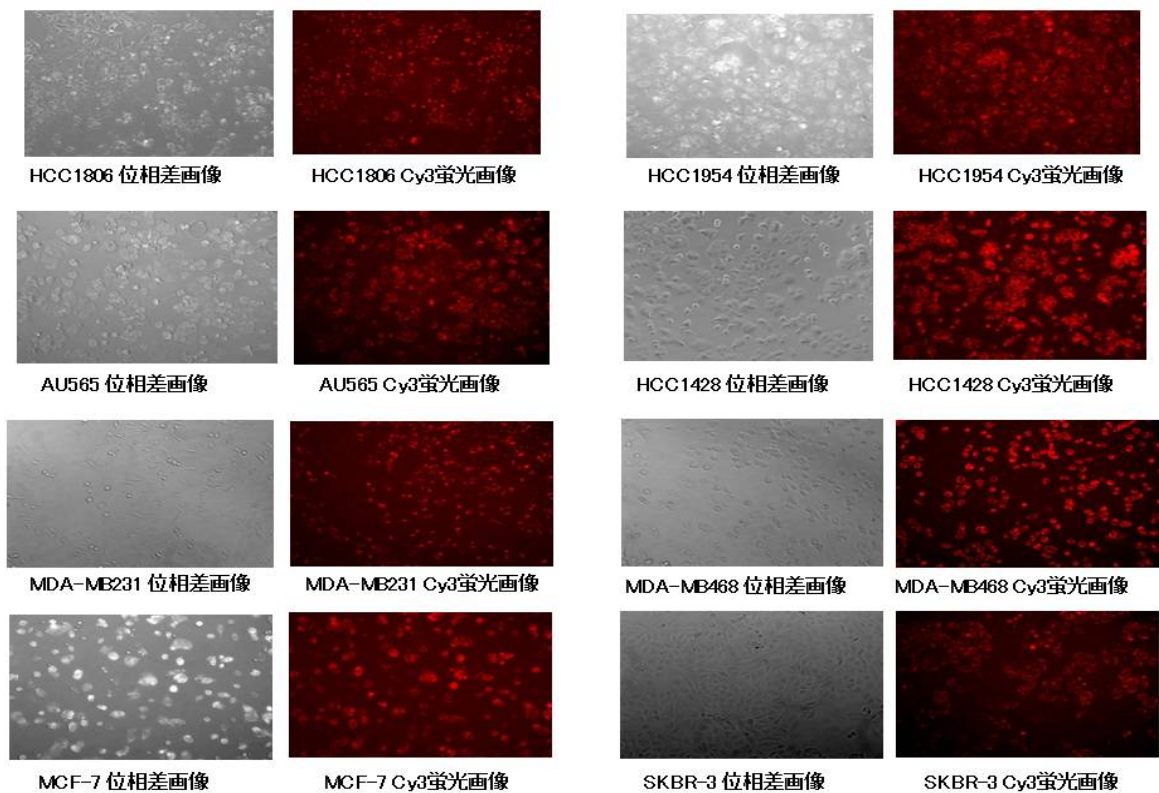


図 4(2)-18 各種乳がん培養細胞株における siRNA の取り込み効率

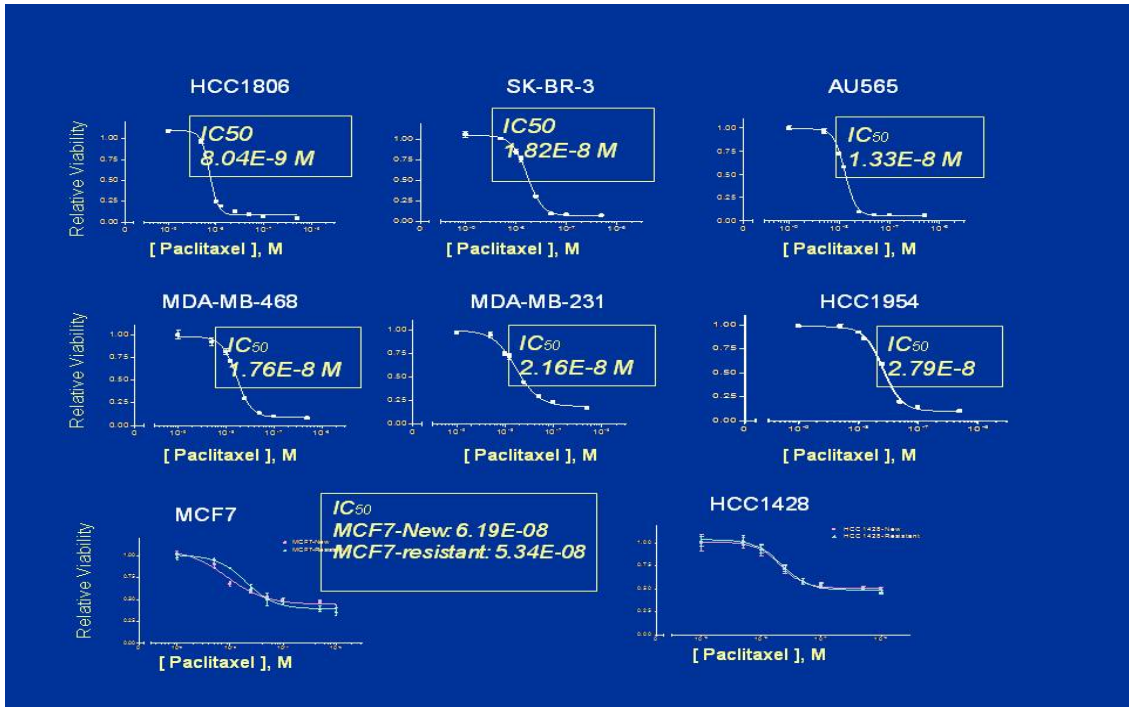


図 4(2)-19 各種乳がん培養細胞におけるパクリタキセル感受性

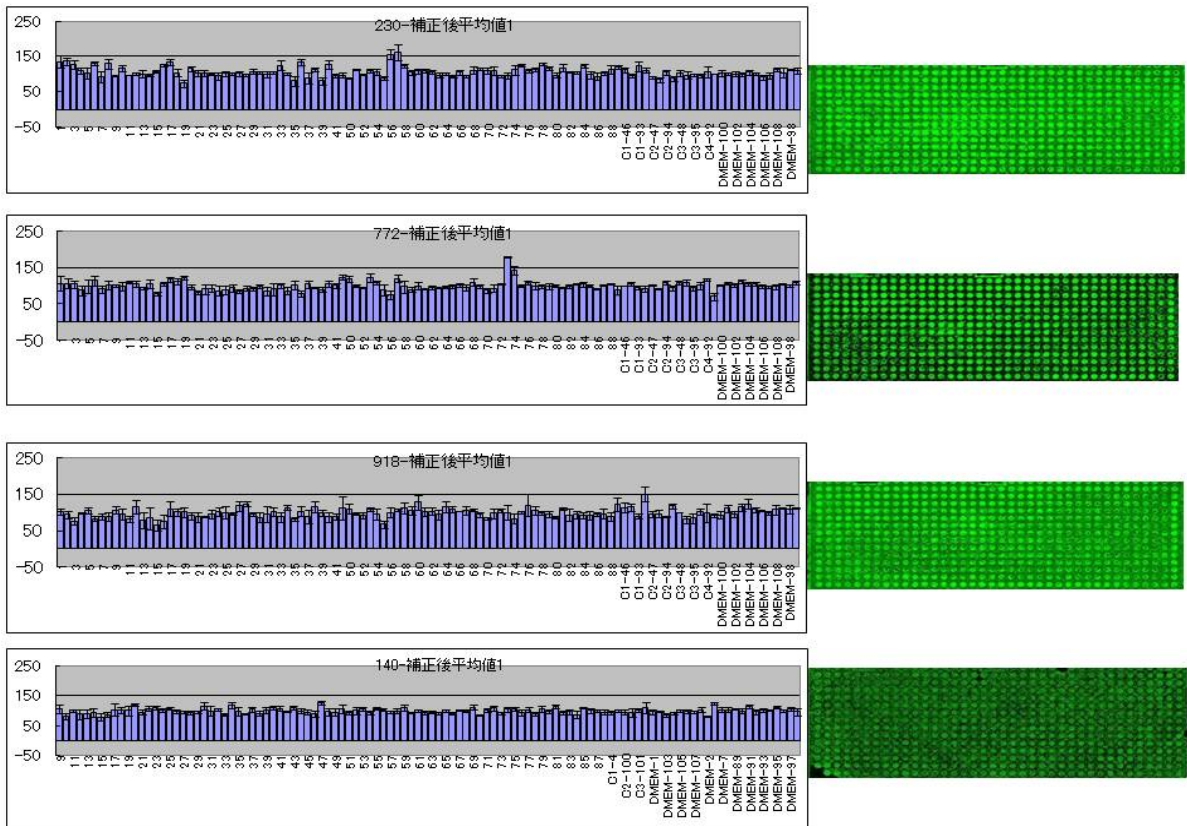


図 4(2)-20 セルアレイ解析による細胞生存率の測定

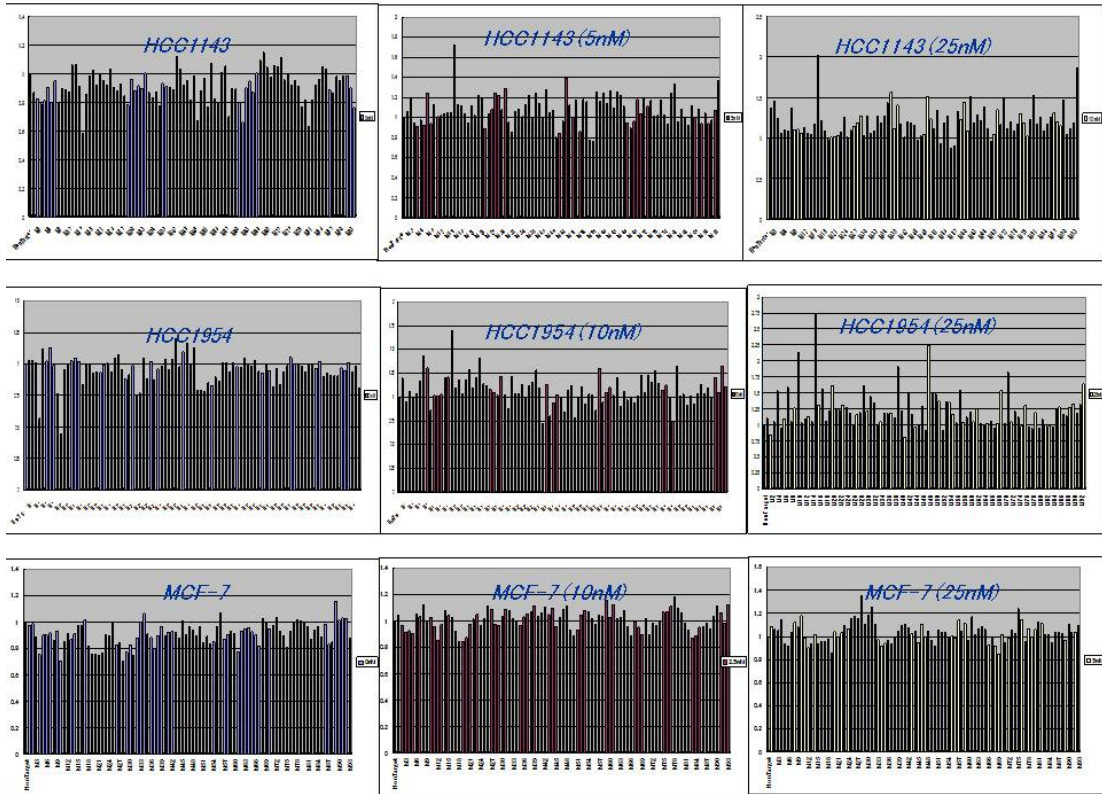


図 4(2)-21 細胞の生死への遺伝子ノックダウンの影響

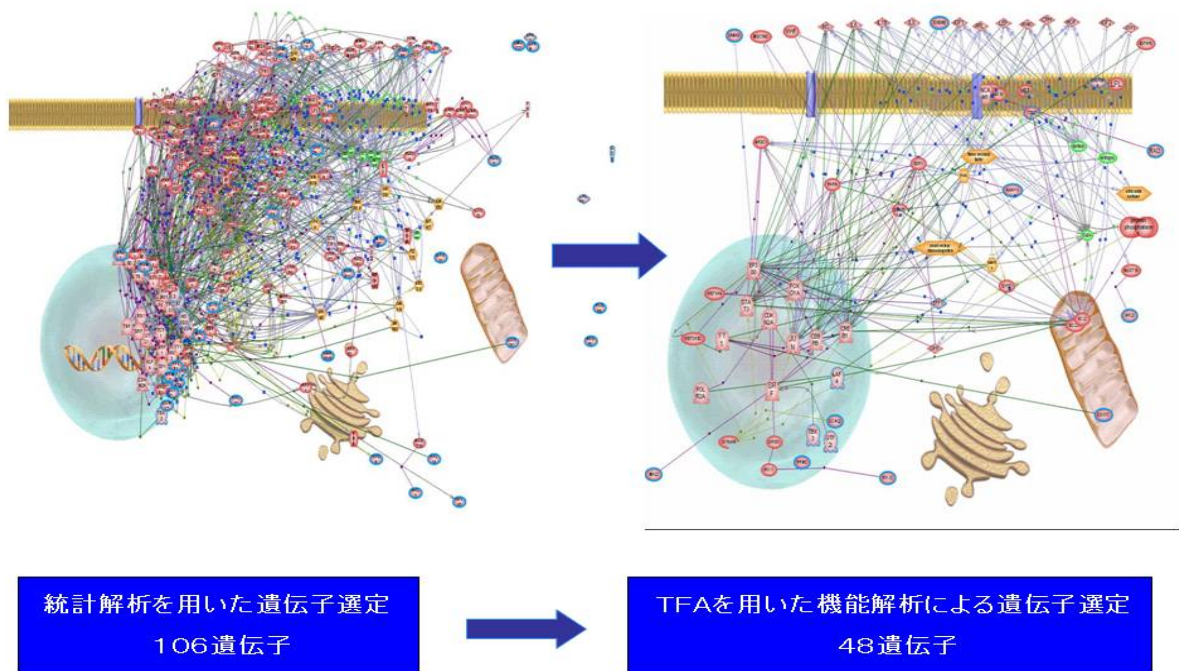


図 4(2)-22 候補遺伝子のネットワーク解析

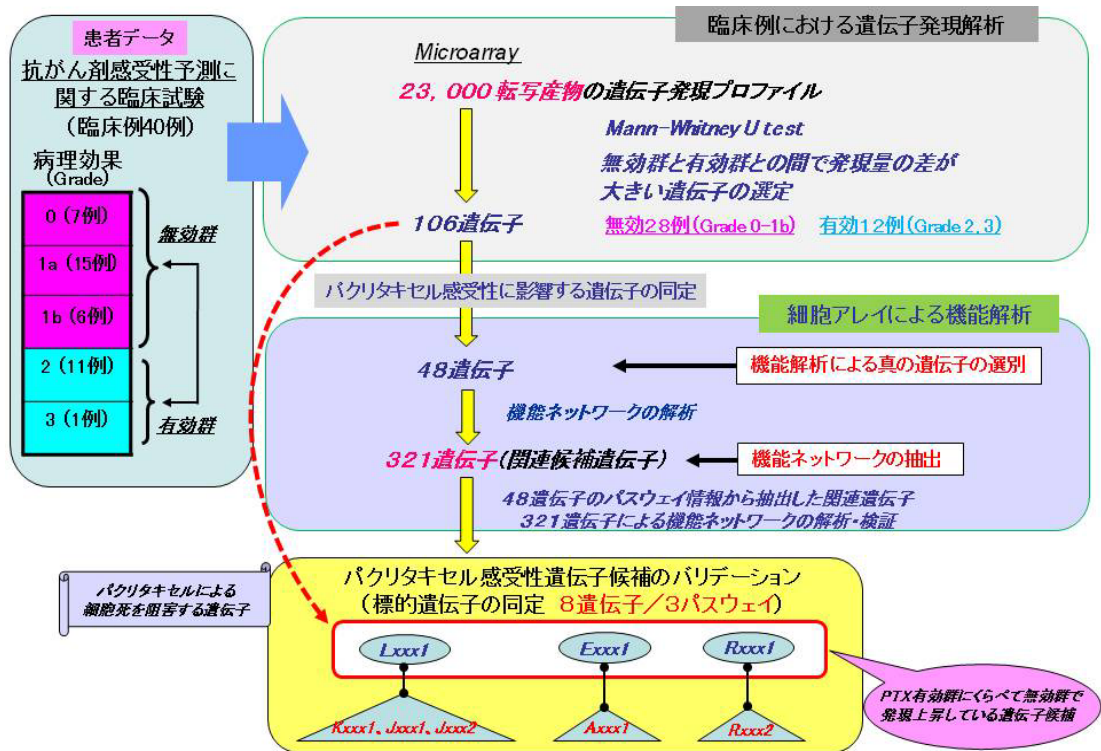


図 4(2)-23 パクリタキセル感受性遺伝子の同定

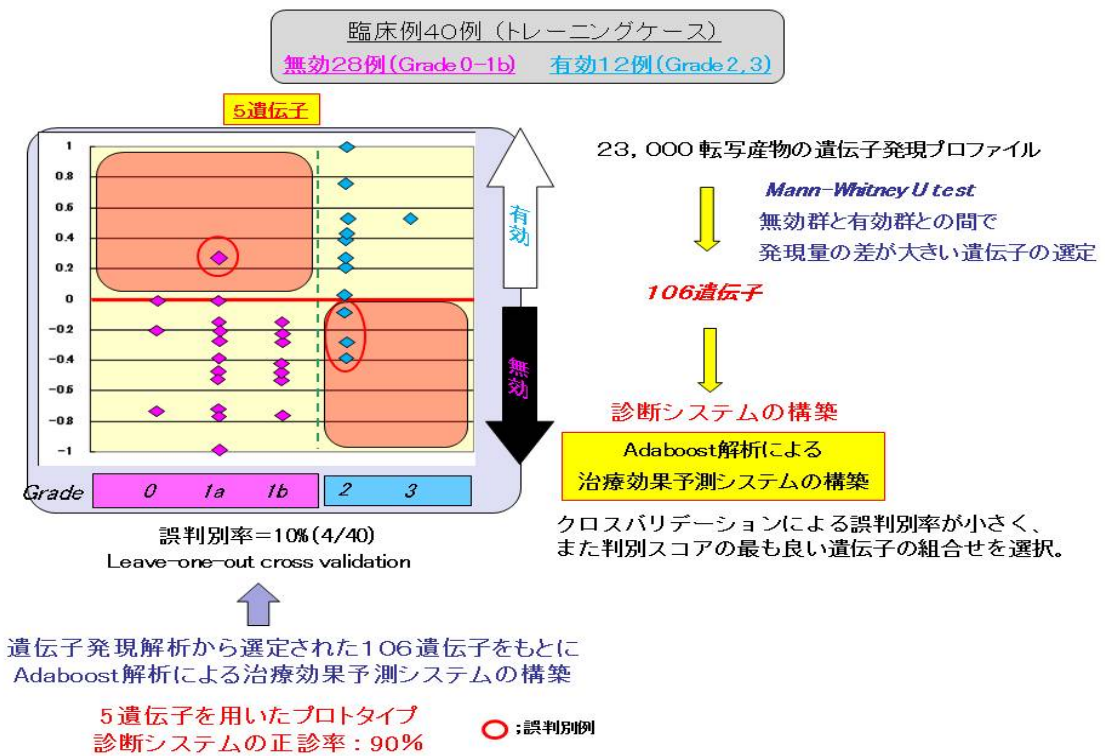


図 4(2)-24 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (従来法)

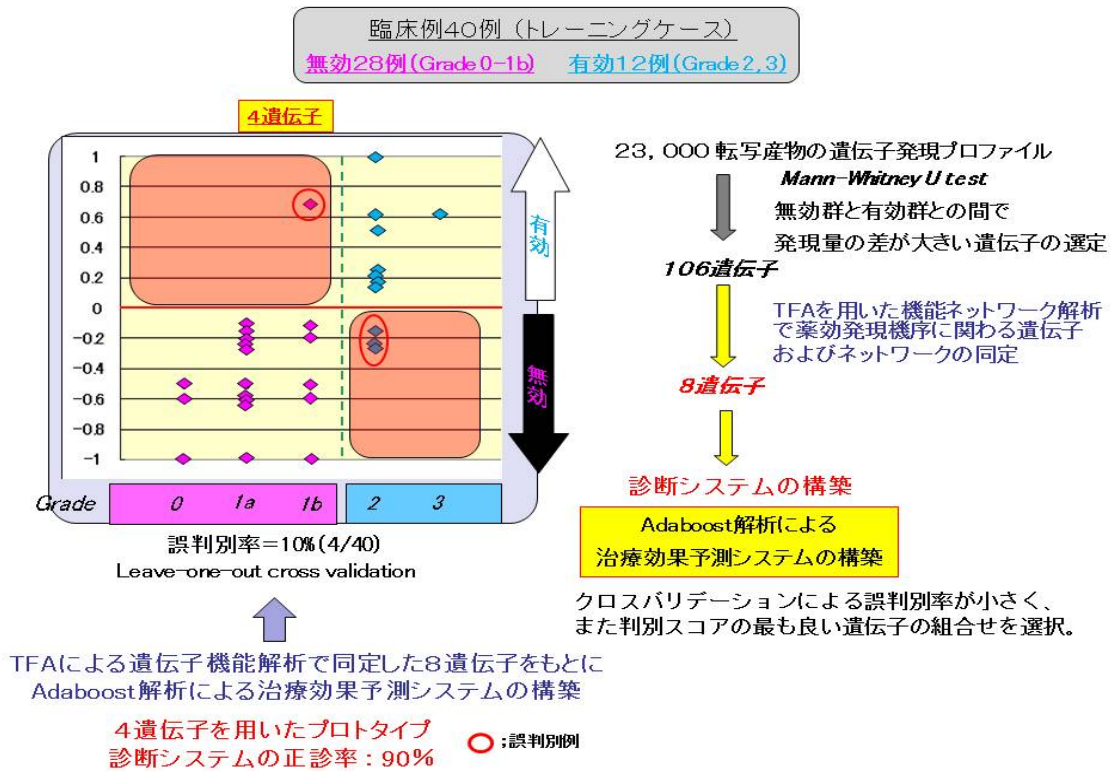


図 4(2)-25 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (セルアレイ解析による遺伝子)

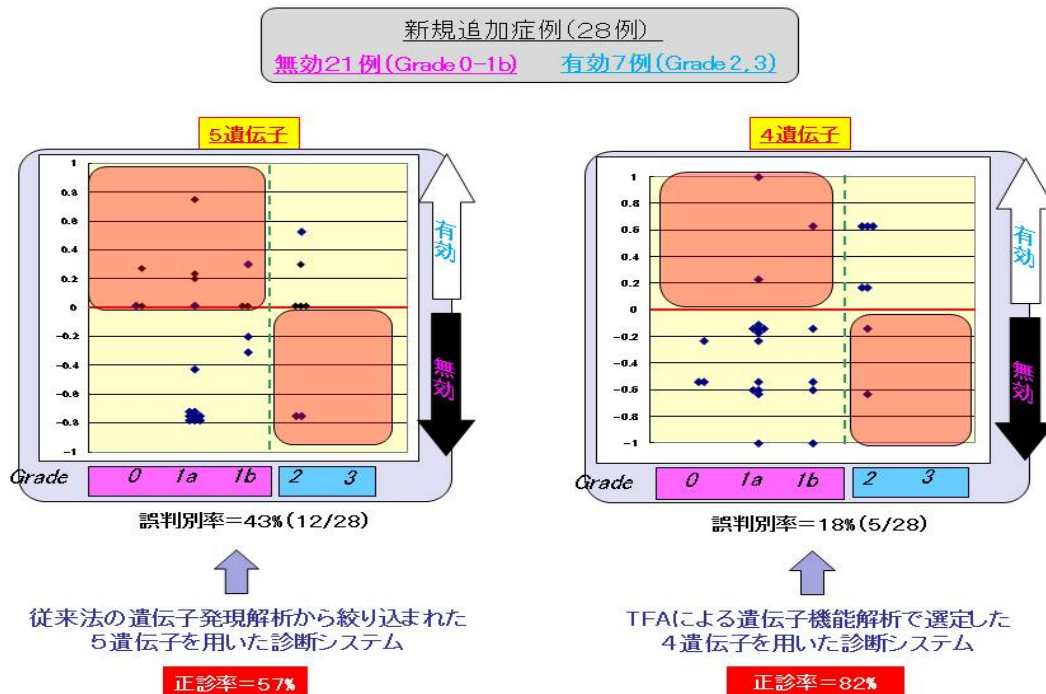


図 4(2)-26 パクリタキセル治療効果予測システムの検証

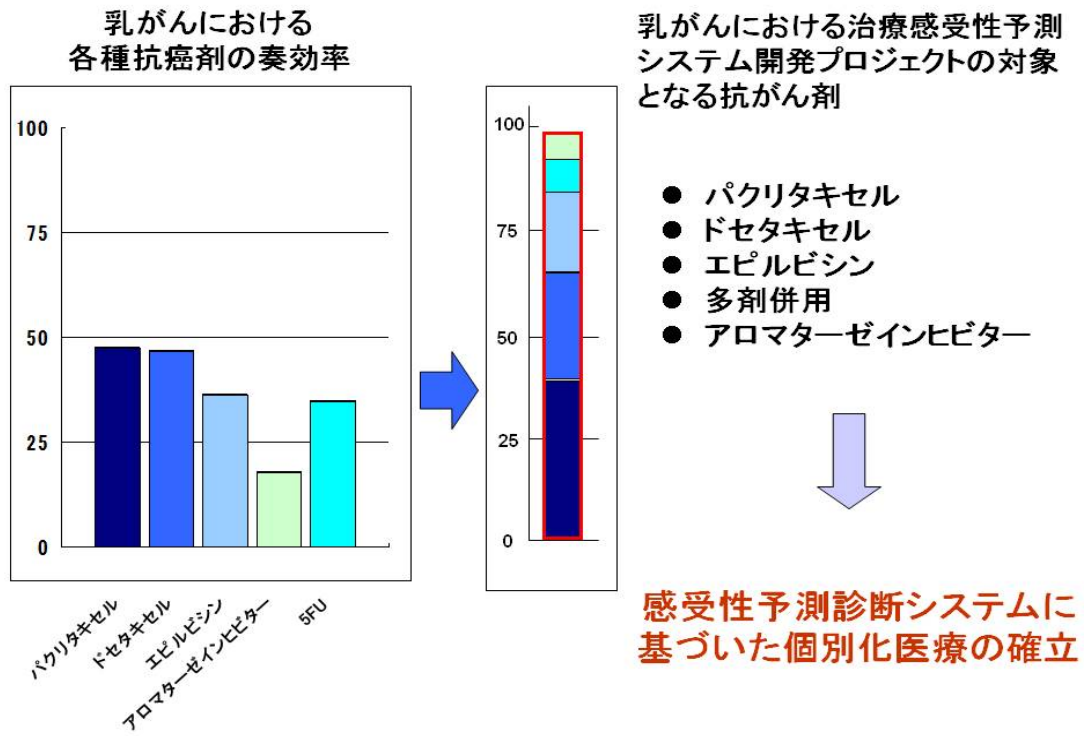


図 4(2)-27 がんの個性に基づいた最も有効な抗がん剤の選択を可能にするシステムの構築

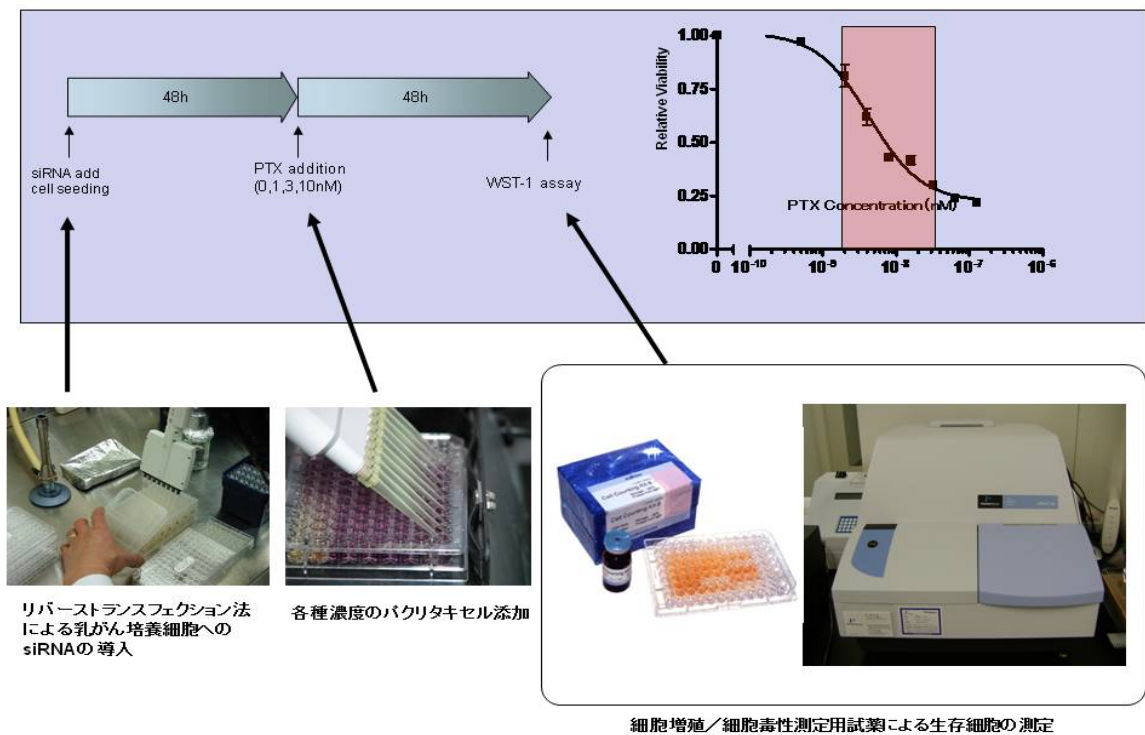


図 4(2)-28 ウェルベース (96 穴プレート) を用いた検証実験

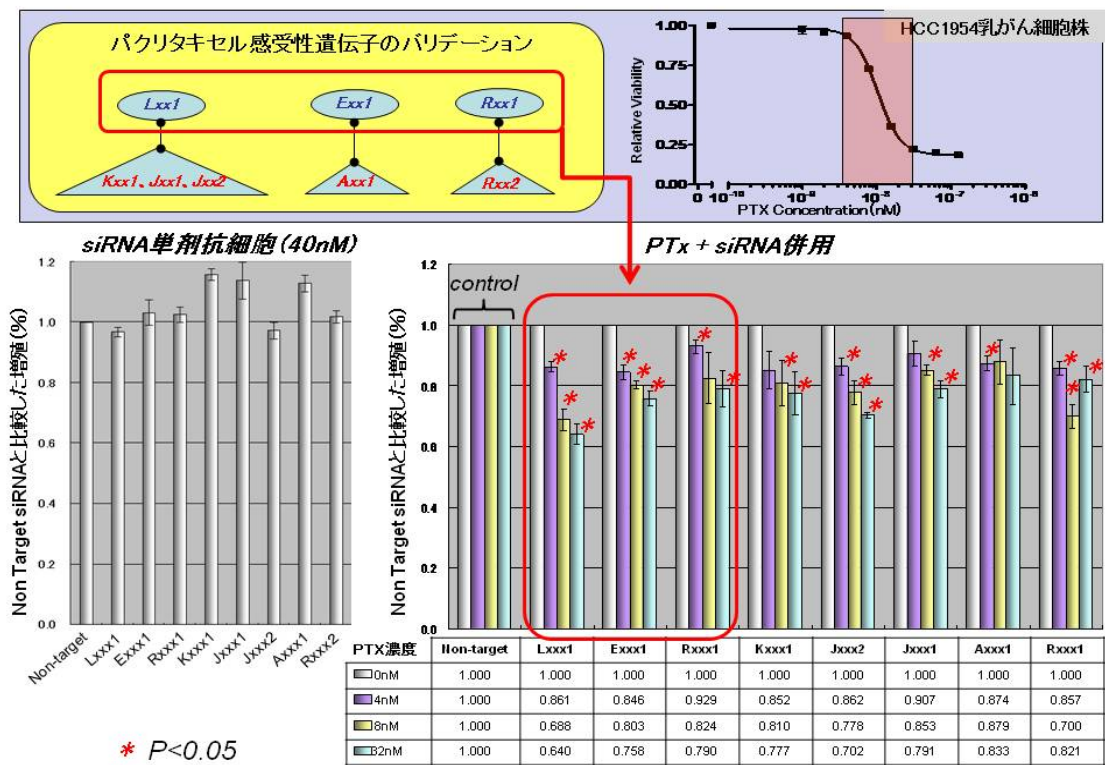


図 4(2)-29 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (1)

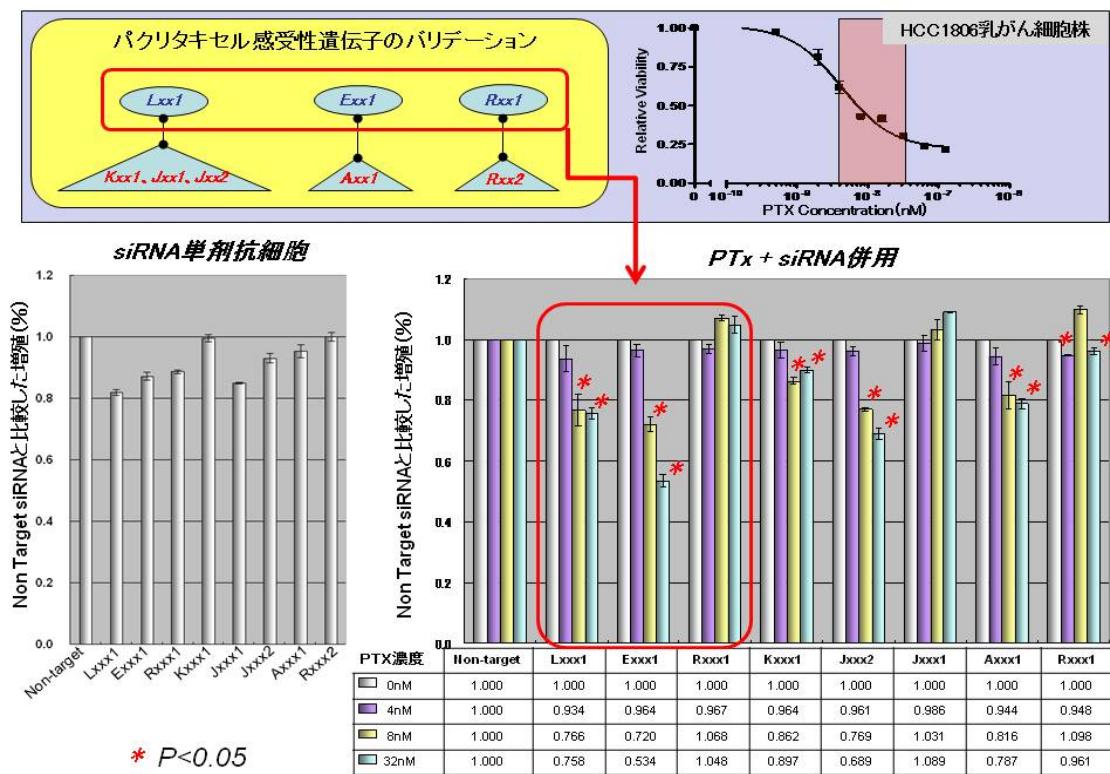


図 4(2)-30 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (2)

— HCC1954乳がん細胞株—

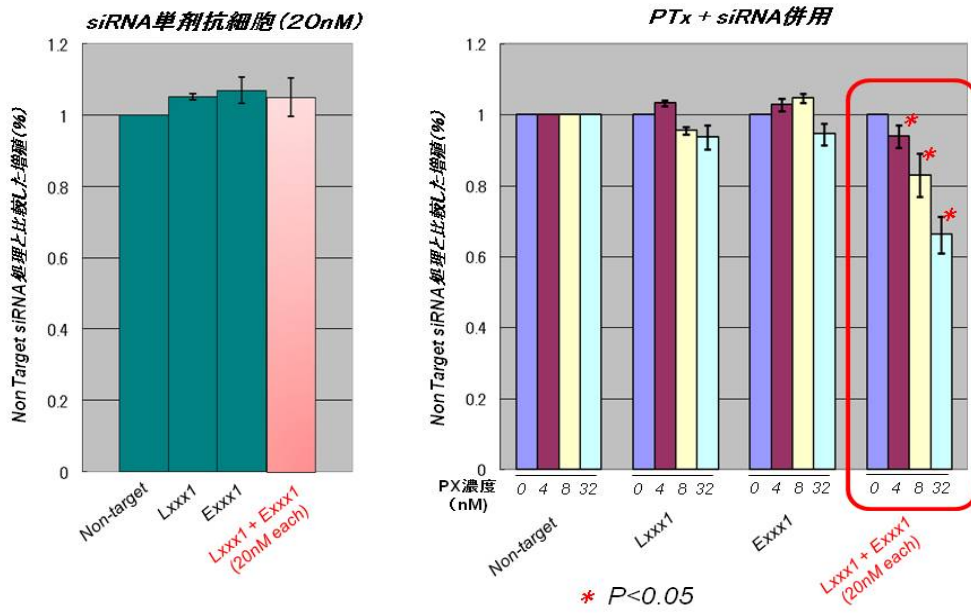


図 4(2)-31 複数パスウェイの組み合わせ阻害によるパクリタキセル感受性増強効果の検証

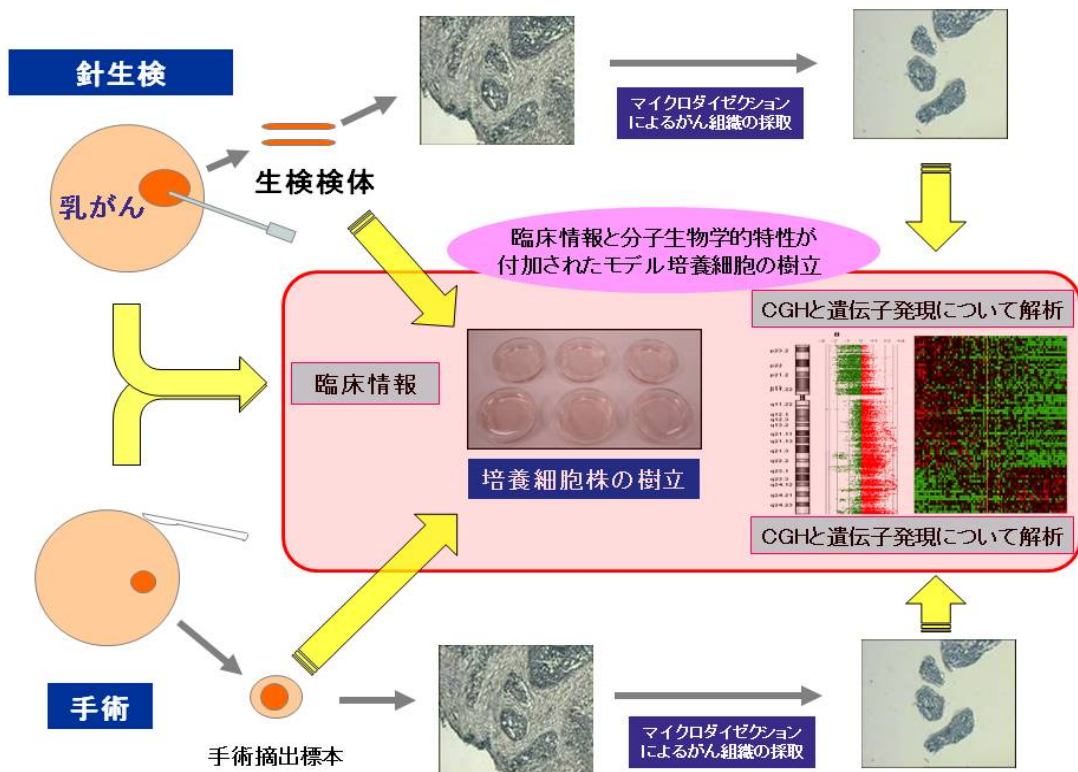
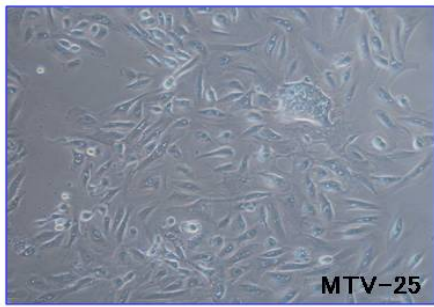
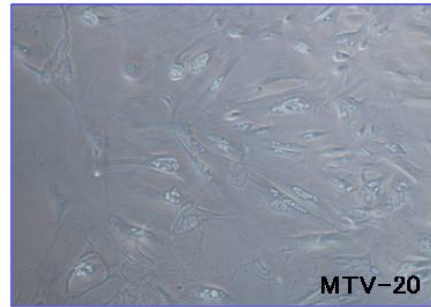


図 4(2)-32 乳がん培養細胞株の樹立

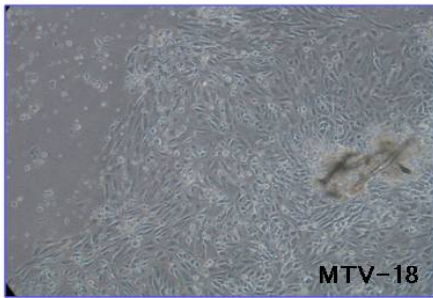
乳がん培養細胞株(MTV-25/10日目)



乳がん培養細胞株(MTV-20/3週目)



乳がん培養細胞株(MTV-18/5週目)



乳がん培養細胞株(MTV-15/9週目)

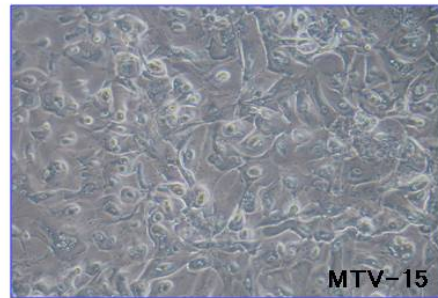
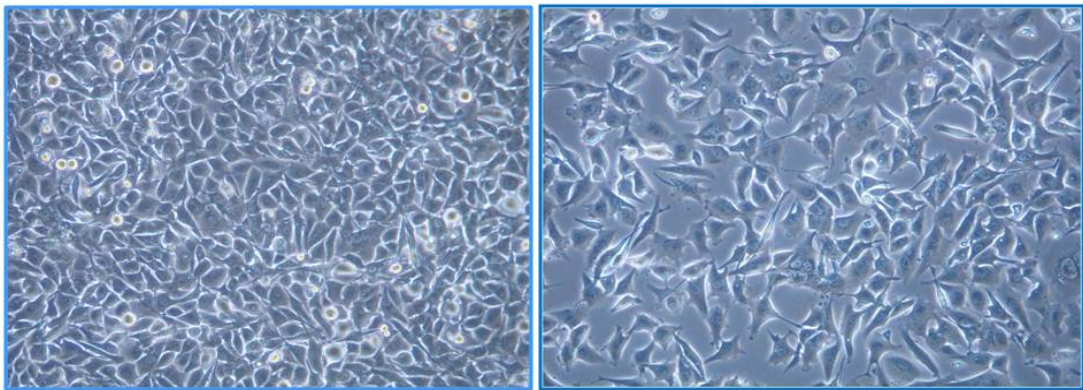


図 4(2)-33 針生検サンプルからの初代培養細胞



臨床材料: 右乳房

病理診断: Partial mastectomy Ad-Ca, solid-tub rt brest
(充実性腺管がん)

リンパ節転移: 0/9

形態: 細長い突起を有する不整形な細胞形態を示す。増殖は早い

特徴: 針生検材料でHER2,ER,PgR negative
細胞株HER2,ER,PgR negative

図 4(2)-34 トリプルネガティブ乳がん培養細胞株

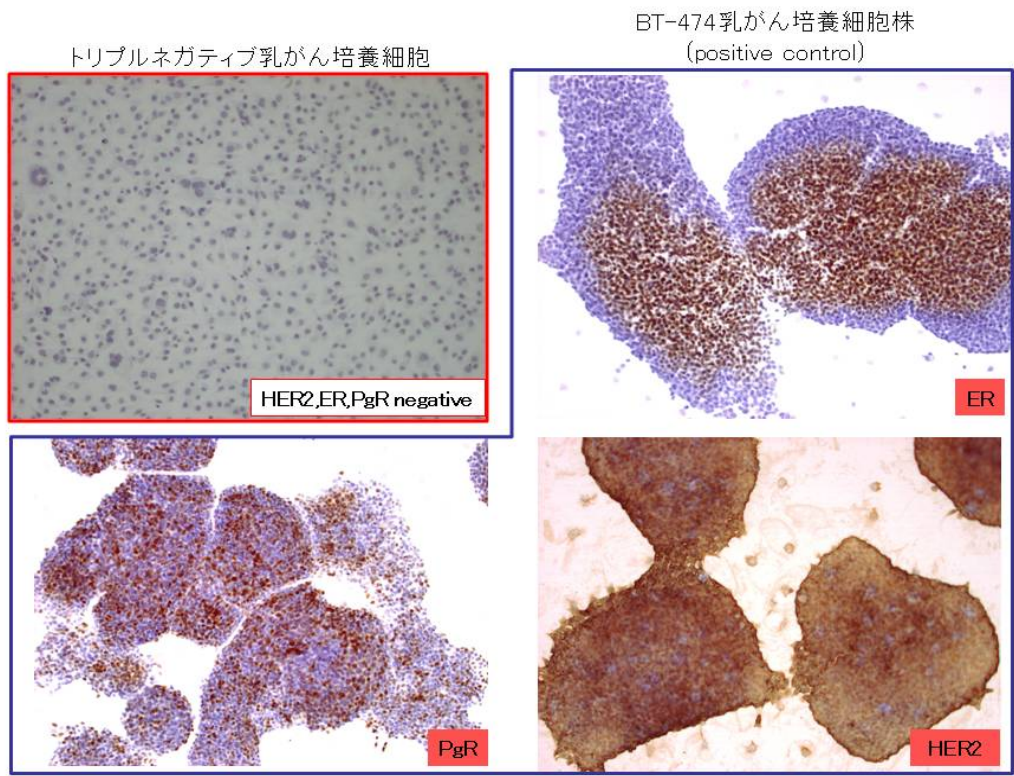


図 4(2)-35 トリプルネガティブ乳がん培養細胞株 (免疫染色)

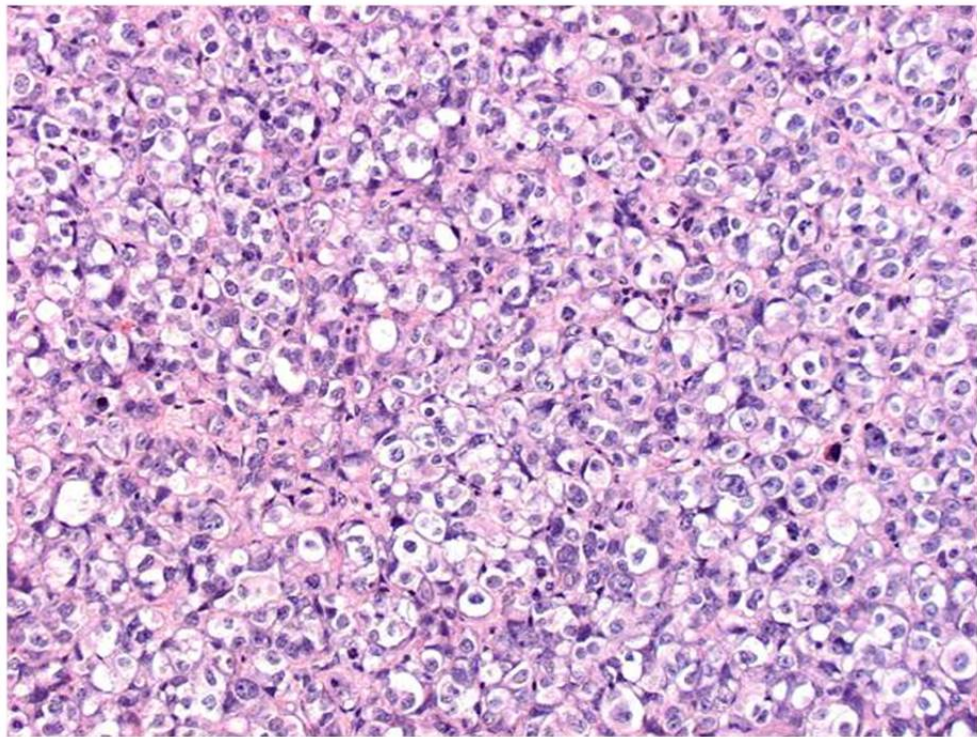
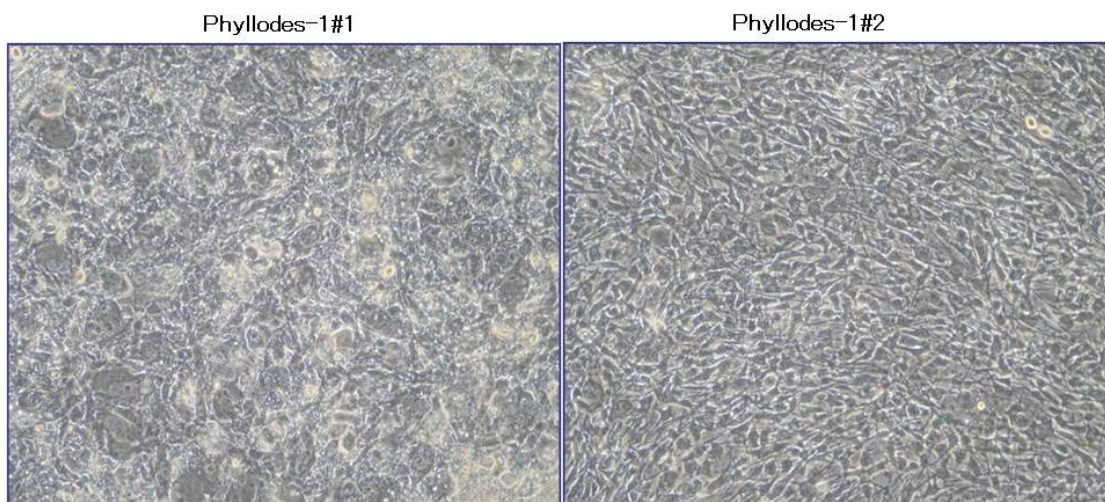


図 4(2)-36 トリプルネガティブ乳がんの SCID マウス移植組織像

Malignant phyllodes tumor#1



臨床材料: 右肺転移巣
病理診断: Malignant phyllodes tumor, metastatic to the right lower lobe of lung, p3, mid-zonal type, lobectomy(origin breast)

図 4(2)-37 葉状腫瘍培養細胞株 (1)

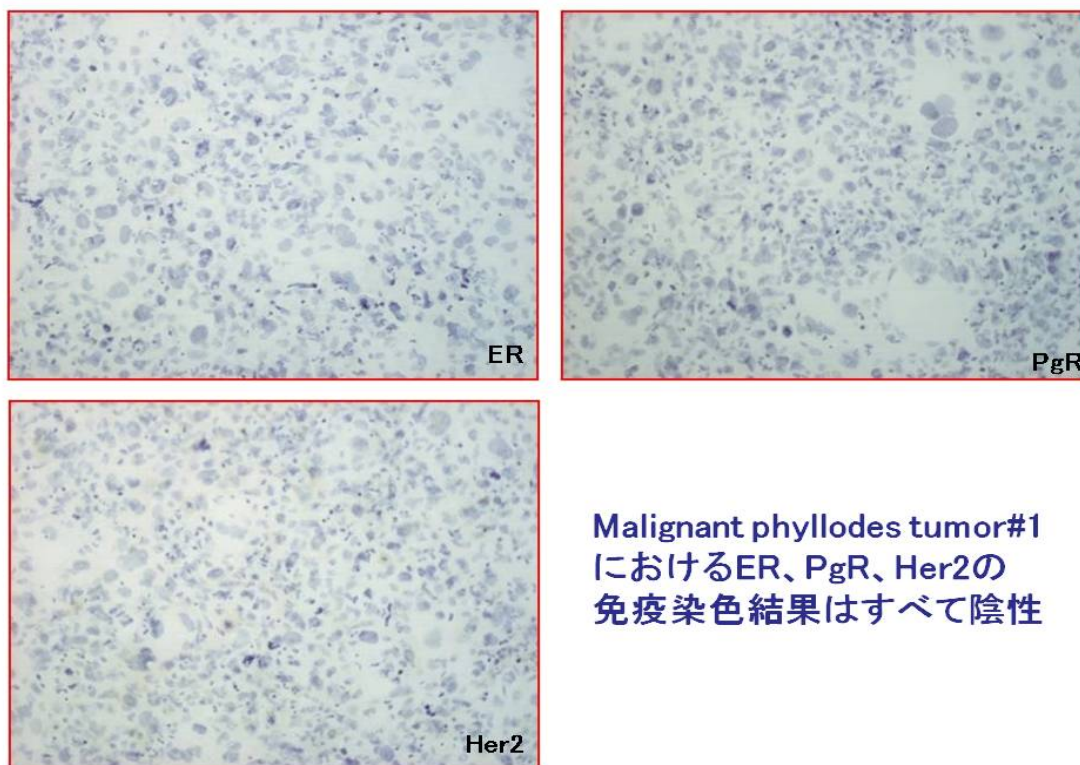


図 4(2)-38 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (1)

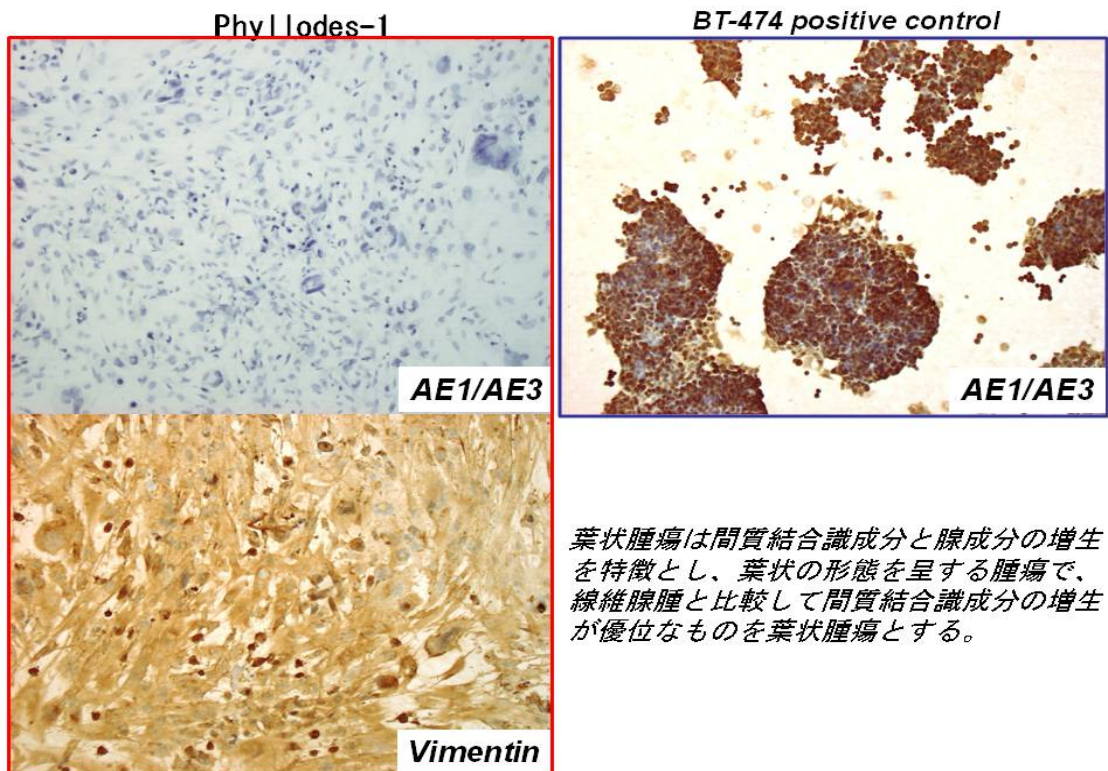
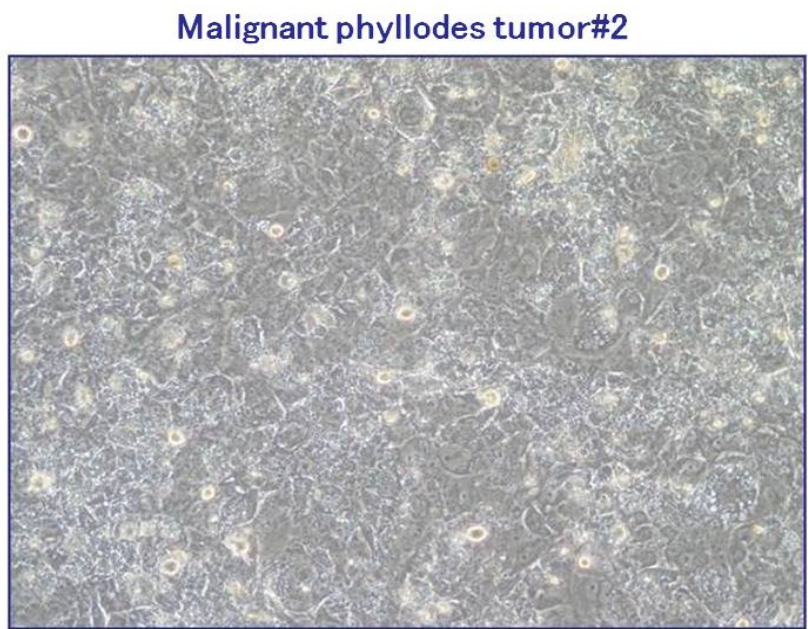


図 4(2)-39 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色（1）



右肺転移巣
病理診断

Malignant phyllodes tumor, metastatic to the right lower lobe of lung,
p0, mid-zonal type (origin breast)

図 4(2)-40 葉状腫瘍培養細胞株（2）

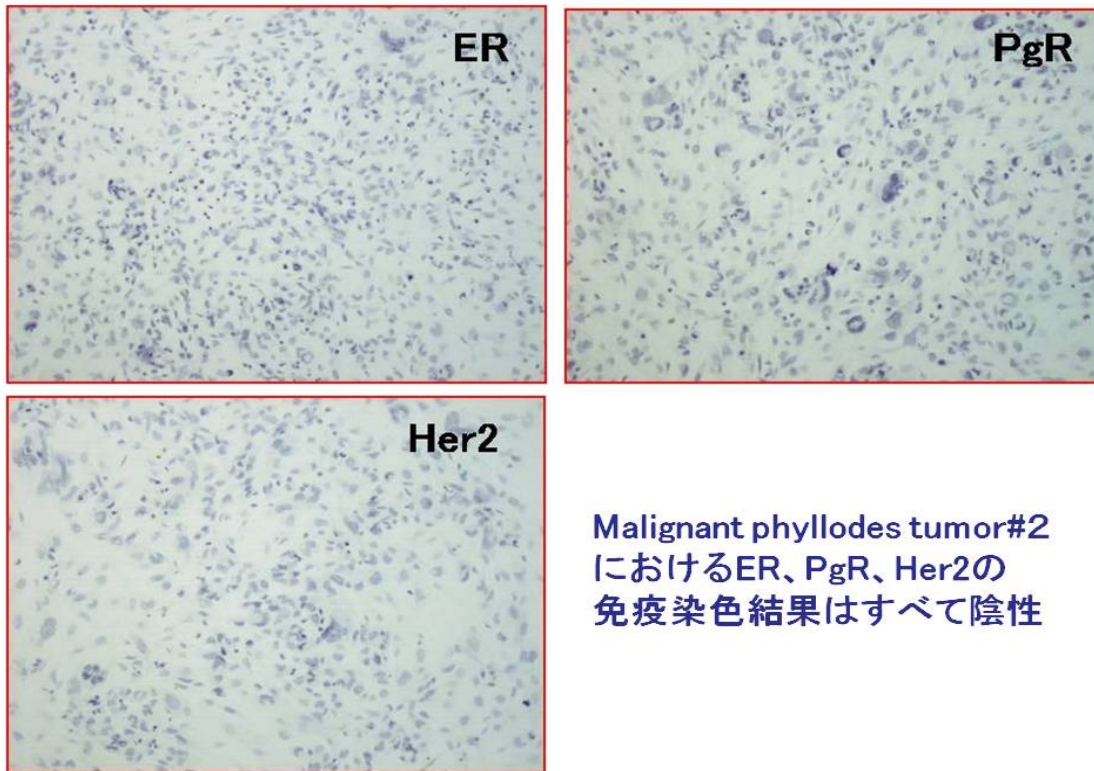


図 4(2)-41 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (2)

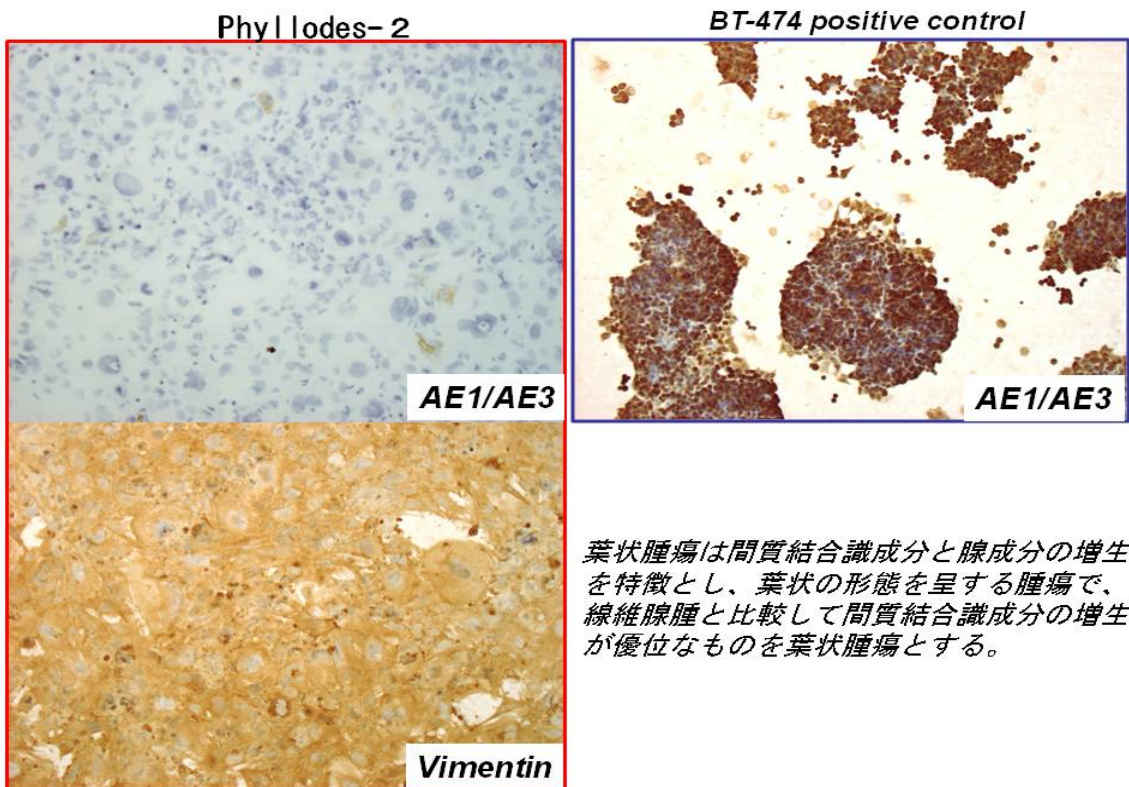


図 4(2)-42 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色 (2)

BrHBC4	髄様腺管がん
BrHBC5	乳頭腺管がん
BrHBC7	硬がん(髄様部分含む)
BrHBC8	炎症性乳がん患者由来の胸水から樹立した上皮由来細胞
BrHBC9	扁平上皮がん由来細胞株
BrHBC10	乳がん患者胸水由来の浮遊細胞株でG-CSF産生を特徴とする
BrHBC11	トリプルネガティブ乳がん(ER、PgR、HER2陰性)充実性腺管がん
Phyllodes-1	原発は葉状腫瘍で肺転移巣から樹立した細胞株
Phyllodes-2	原発は葉状腫瘍で肺転移巣から樹立した細胞株

図 4(2)-43 ヒト乳がん由来細胞株

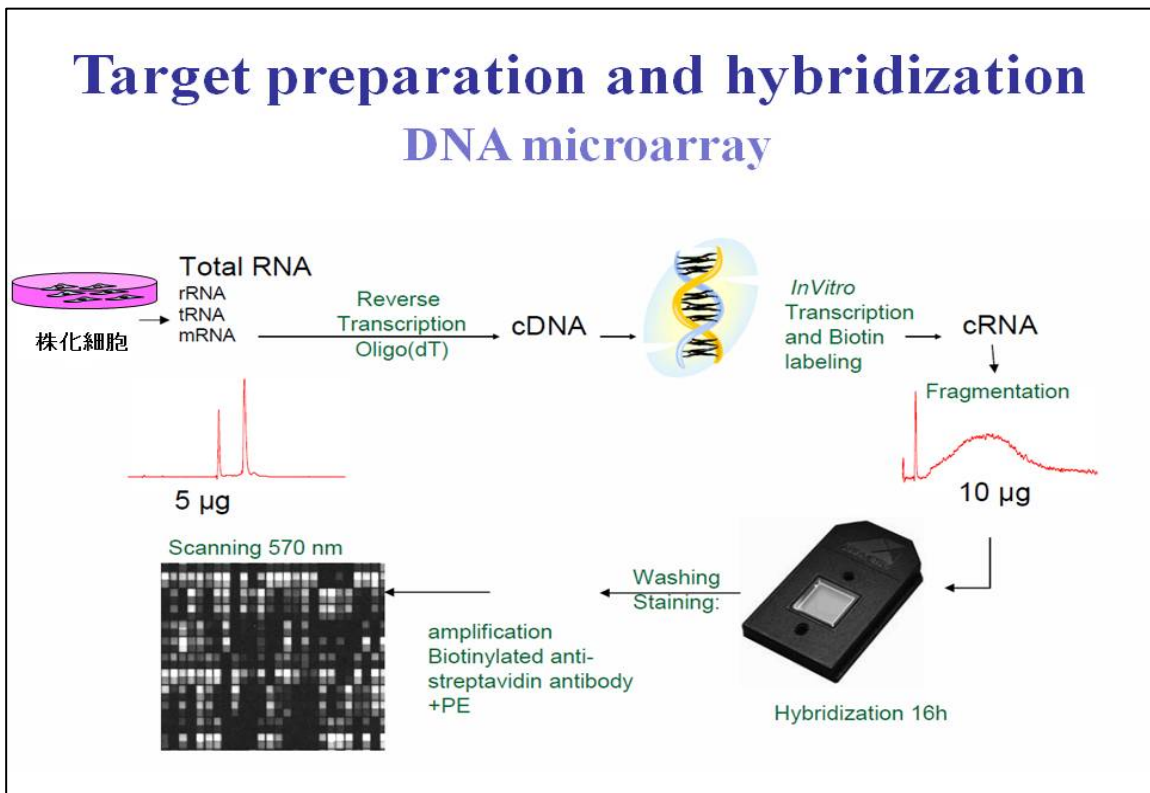


図 4(2)-44 樹立した培養細胞の遺伝子発現解析

—乳がん培養細胞株HBC11(トリプルネガティブ乳がん)—

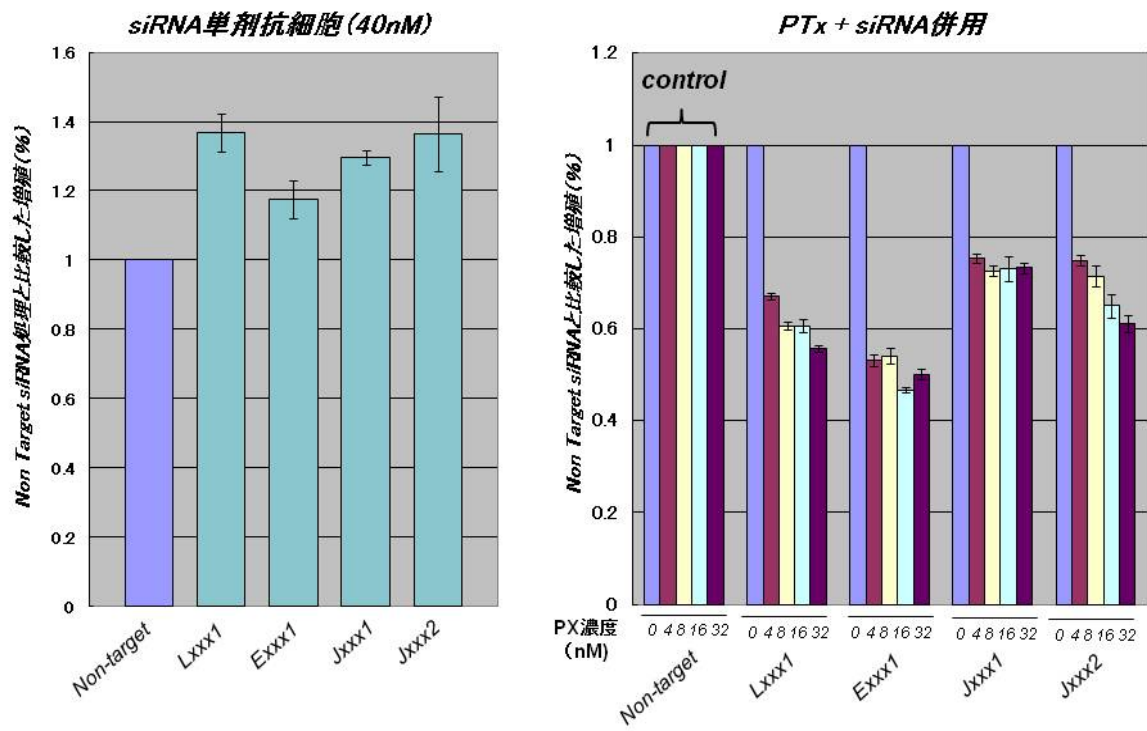


図 4(2)-45 樹立した培養細胞におけるパクリタキセル感受性規定遺伝子の検証

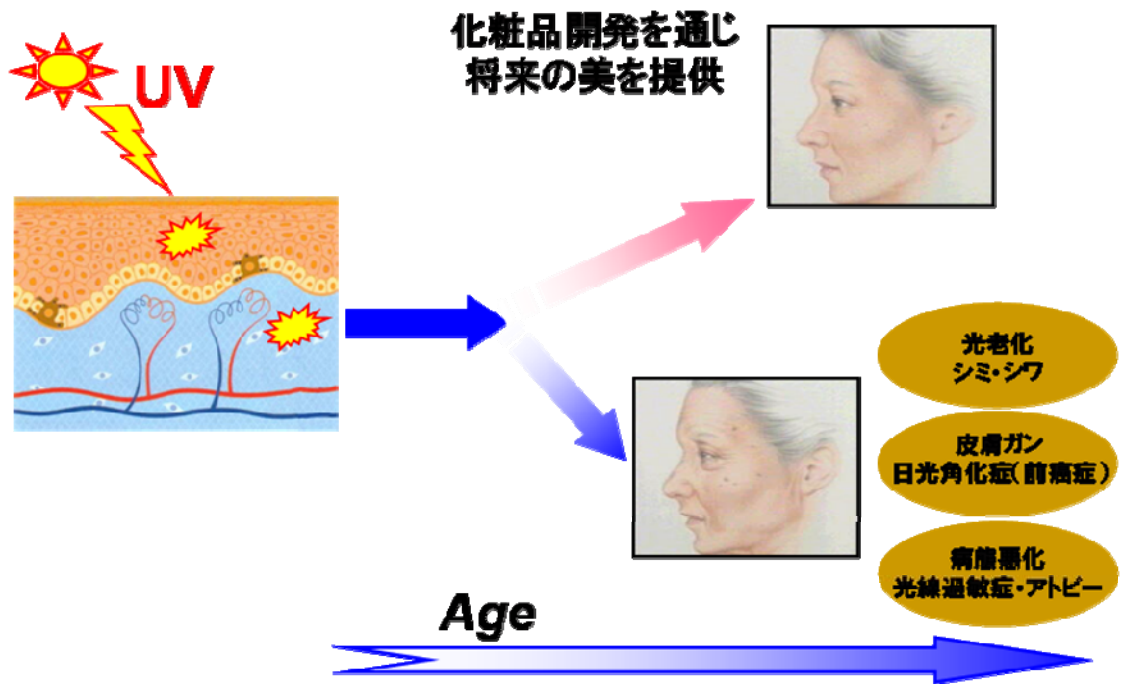


図 4(3)-1 紫外線は皮膚老化を加速させる最大の環境要因

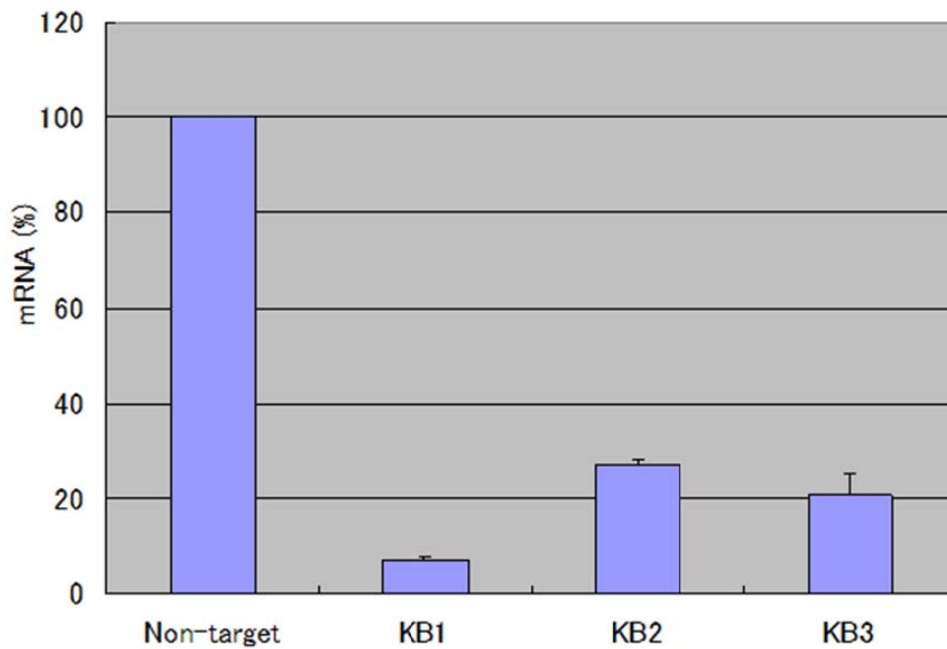


図 4(3)-2 KB 遺伝子の RNA 干渉による発現抑制

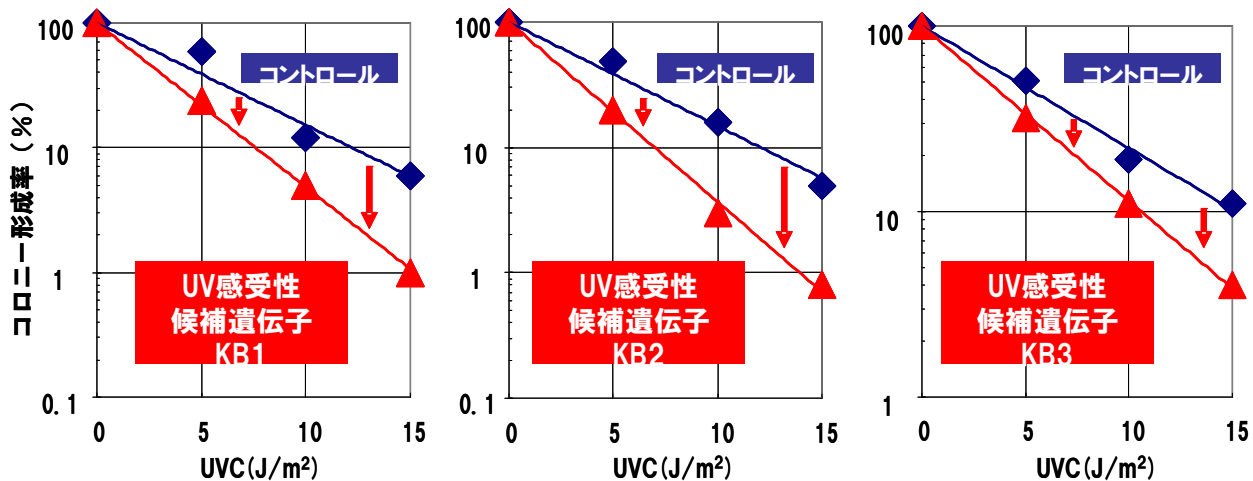


図 4(3)-3 KB 遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

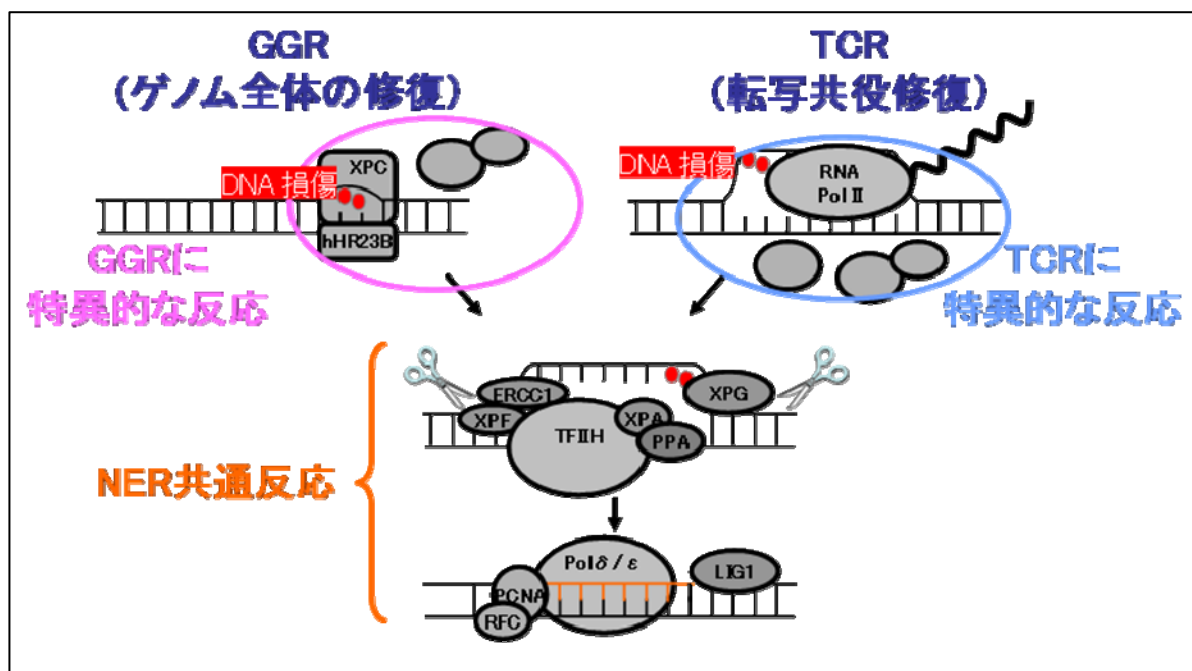


図 4(3)-4 ヌクレオチド除去修復 (NER) の 2 つの反応経路

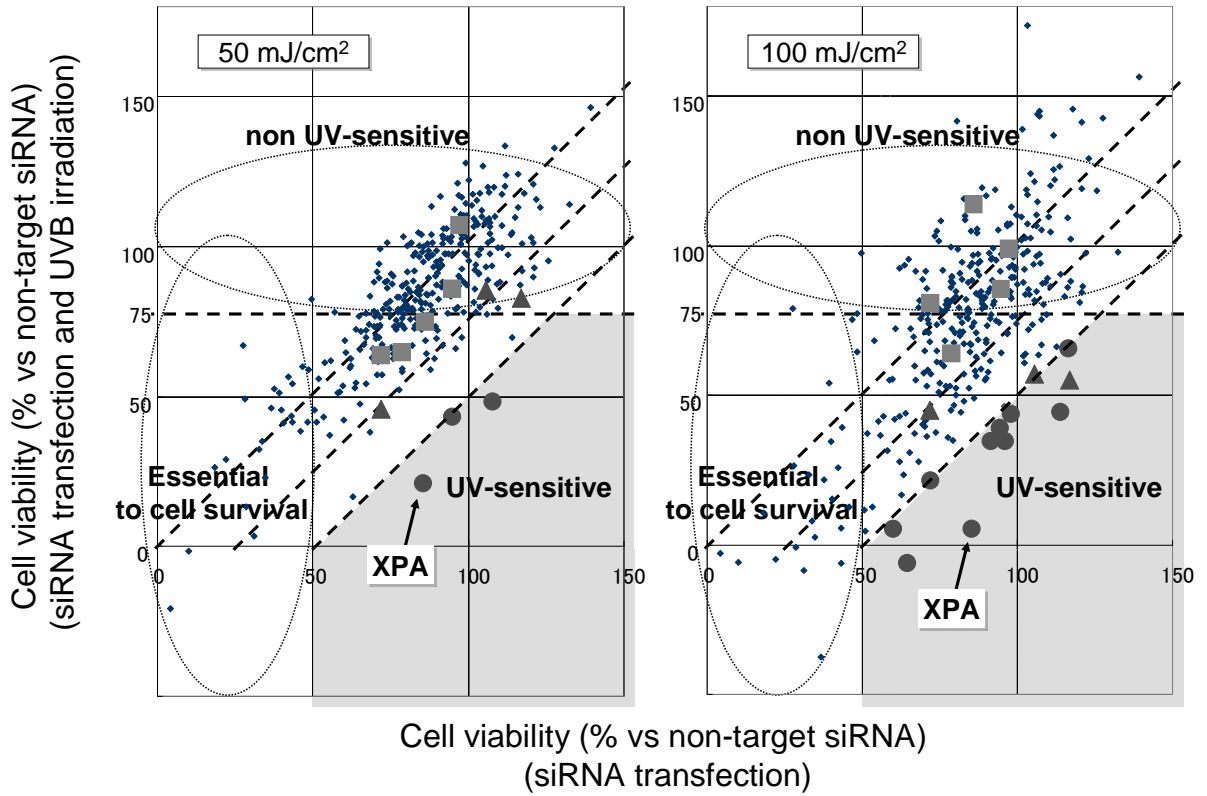


図 4(3)-5 RNA 干渉および紫外線照射後の細胞生存率

- : 紫外線感受性候補遺伝子、■ : GGR 特異的の反応に関わる遺伝子
- ▲ : TCR 特異的の反応に関わる遺伝子

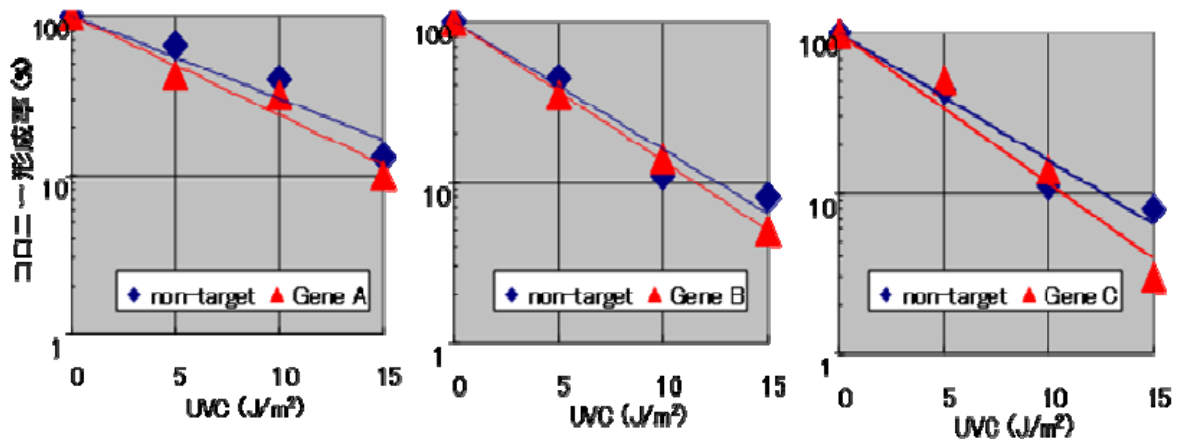


図 4(3)-6 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

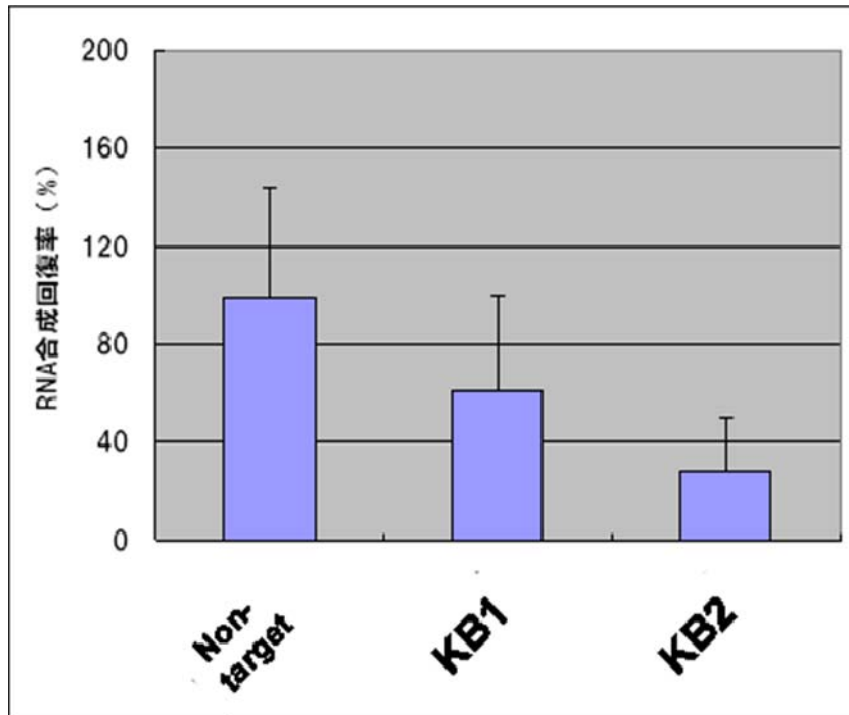


図 4(3)-7 KB 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響

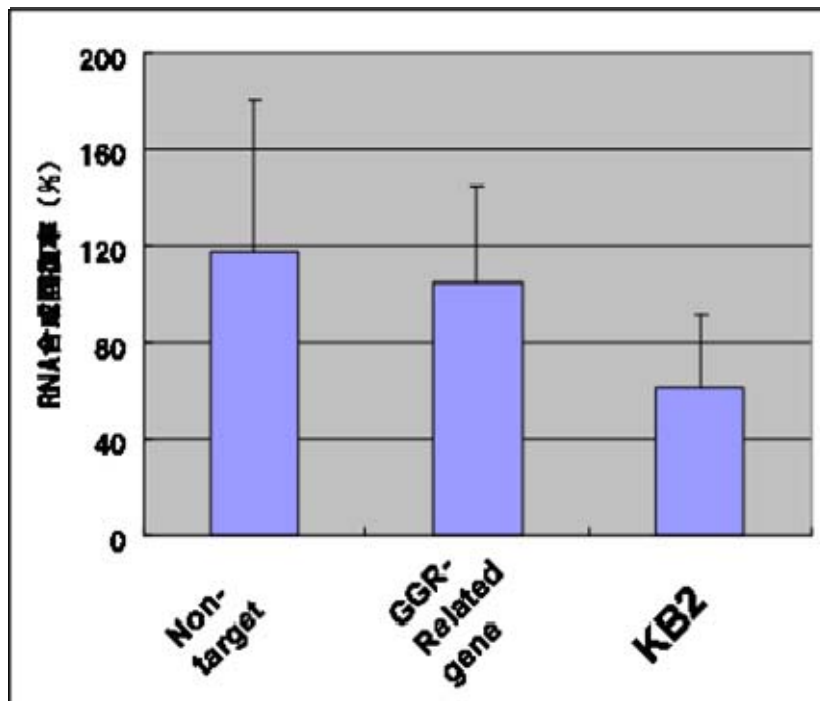


図 4(3)-8 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子および KB2 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響

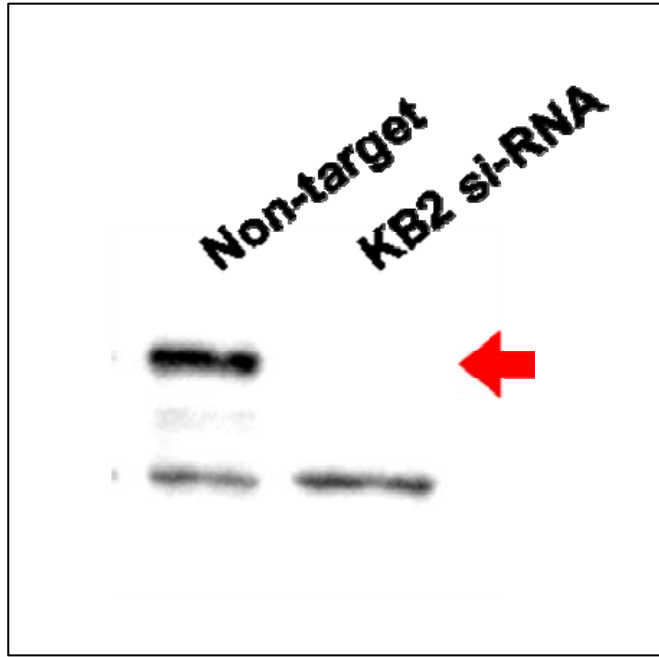


図 4(3)-9 KB2 のウェスタン解析

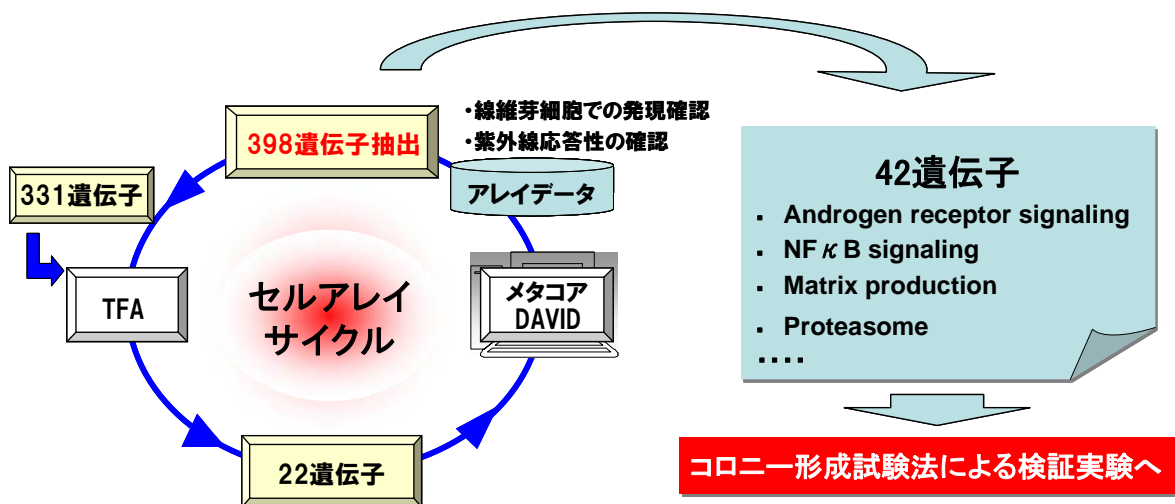


図 4(3)-10 紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張スキーム

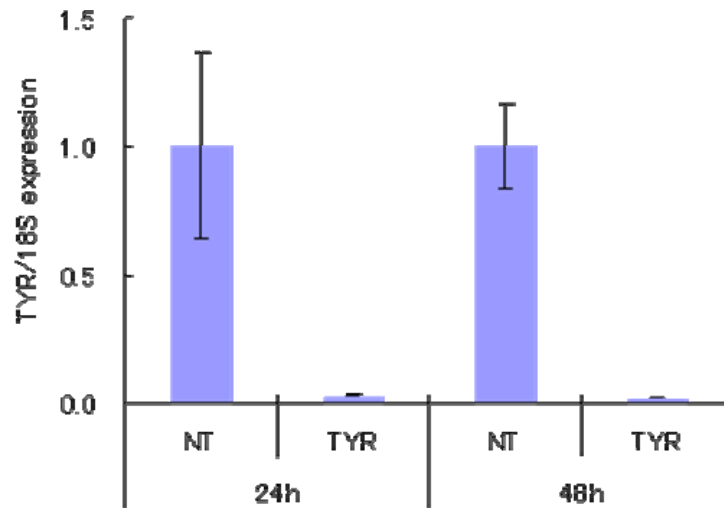


図 4(3)-11 固相リバーストランスフェクション法によるヒト正常メラノサイトの Tyrosinase 遺伝子発現抑制
NT, Non-target siRNA; TYR, Tyrosinase siRNA

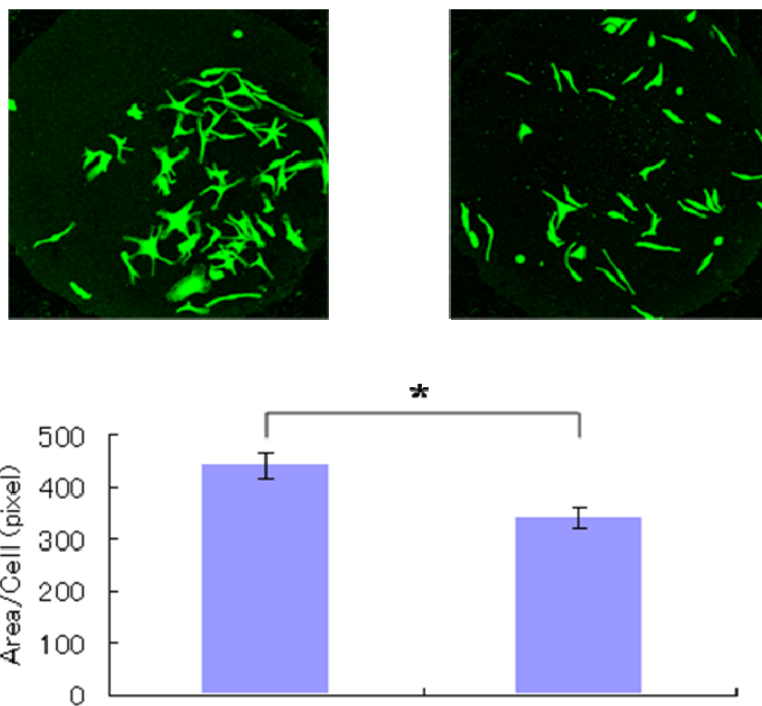


図 4(3)-12 メラノサイトの蛍光標識（上部画像）と形態変化（細胞面積）の数値化（下部グラフ）
左：増殖用培地で培養したメラノサイト（活性化状態）
右：最小培地で培養したメラノサイト（不活性化状態）
* t-test ($p < 0.05$)

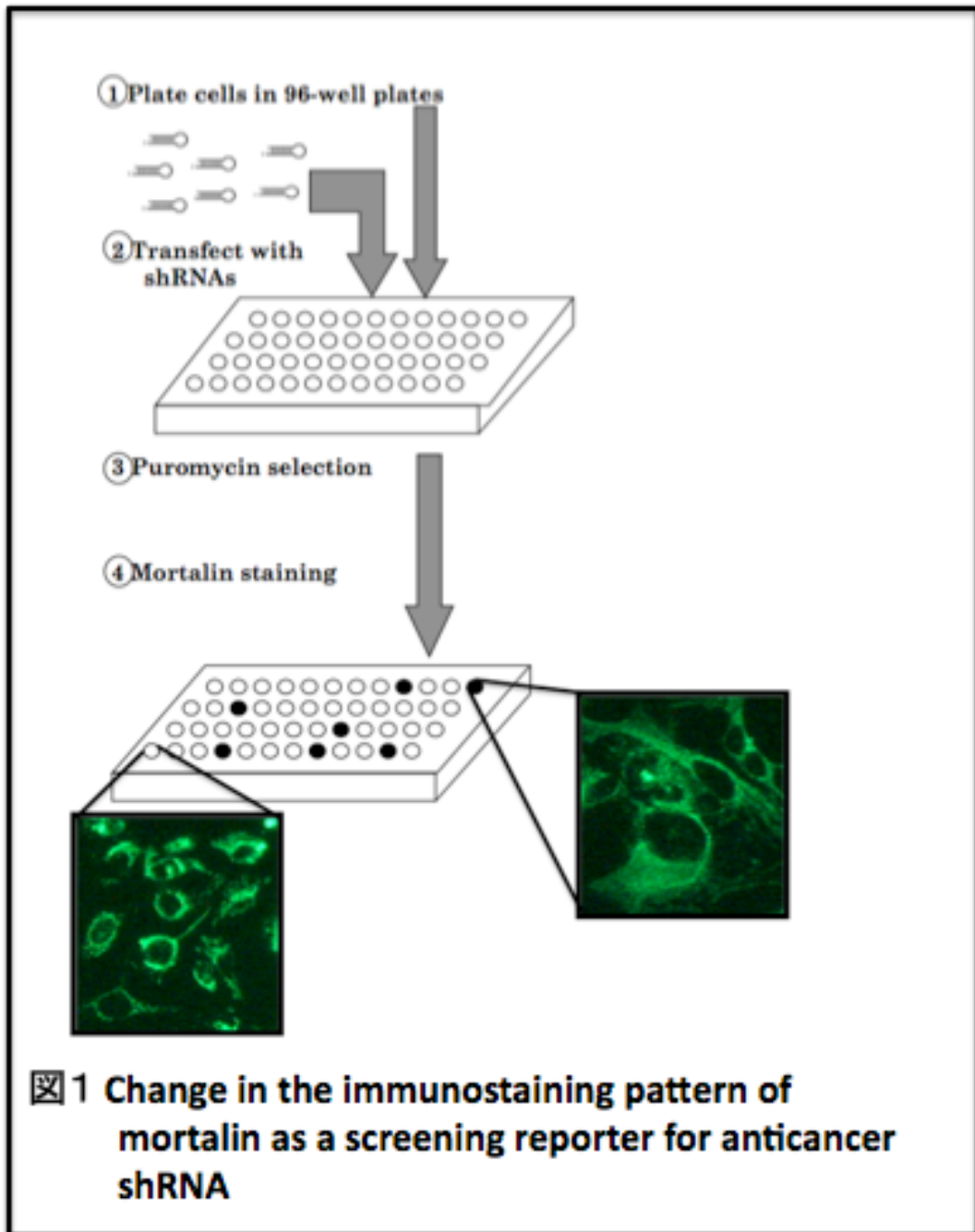


图 4(4)-1

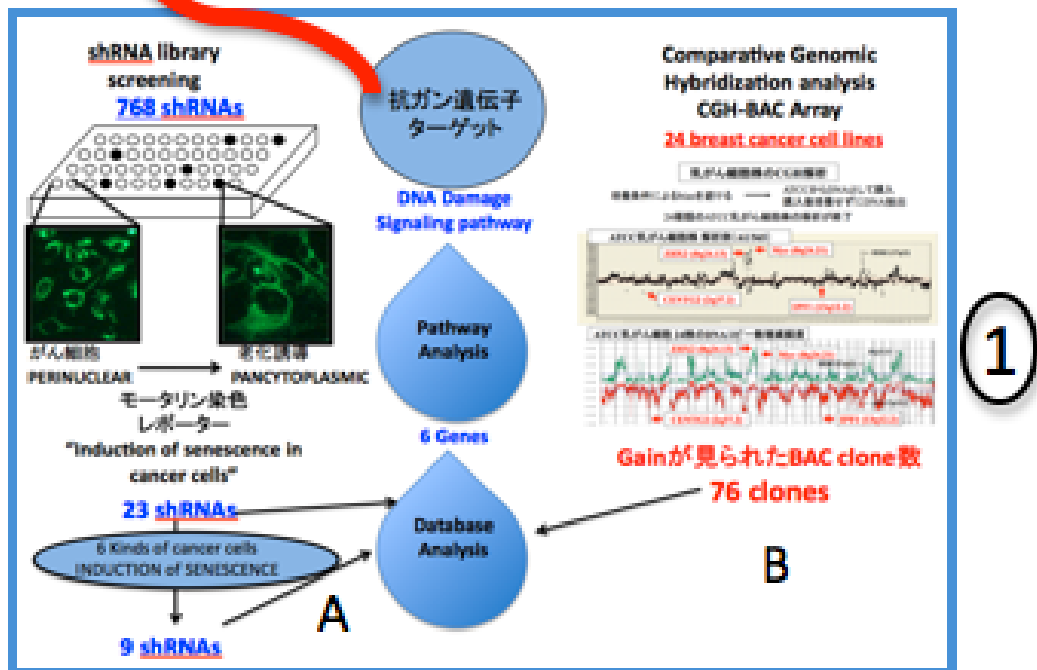
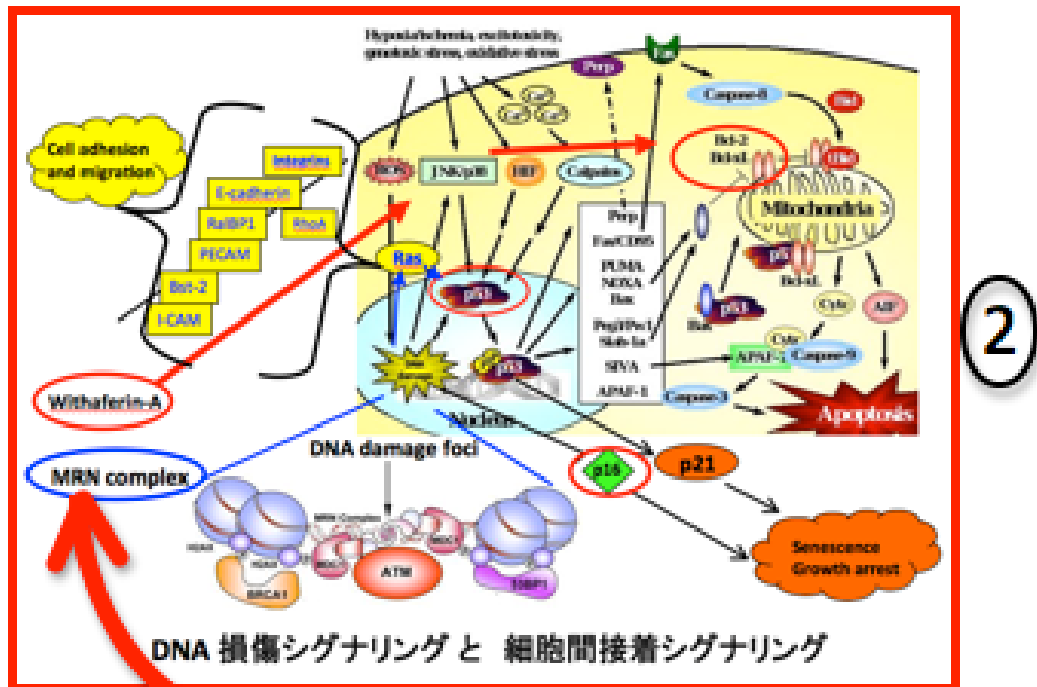


図2 Gene targets identified from the gene silencing and CGH screening of cancer cells hit DNA damage signaling pathway as a candidate target pathway

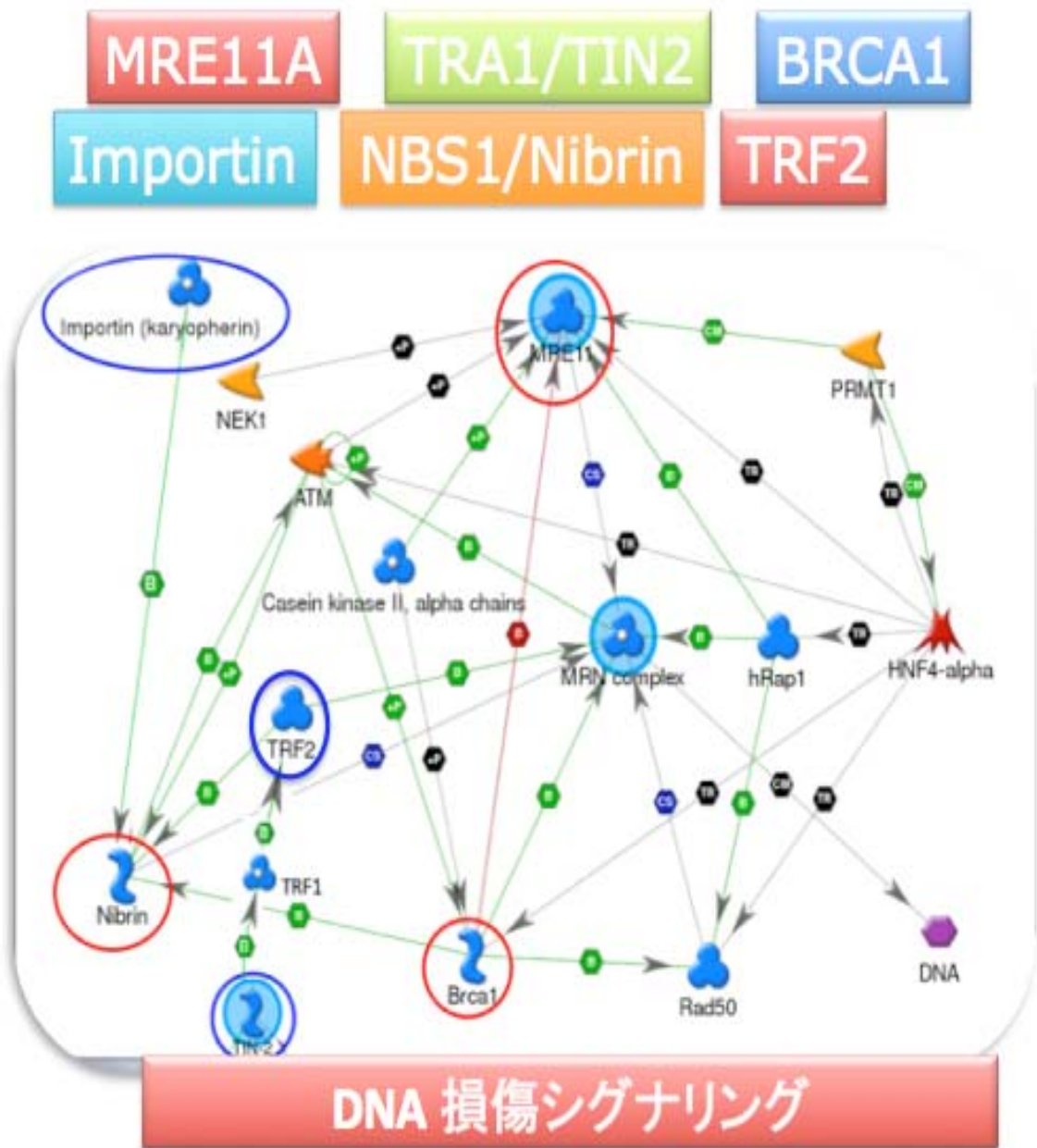
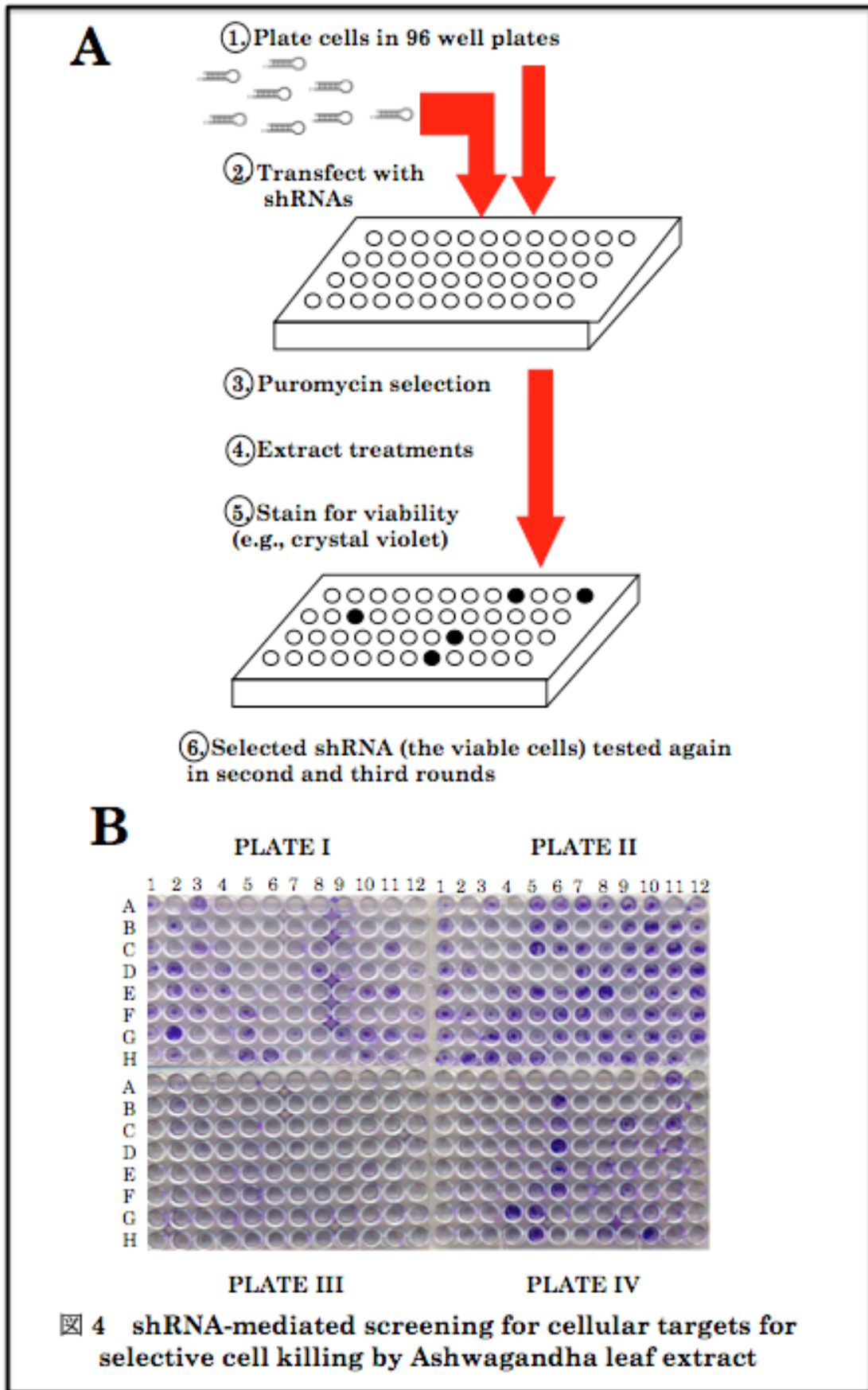
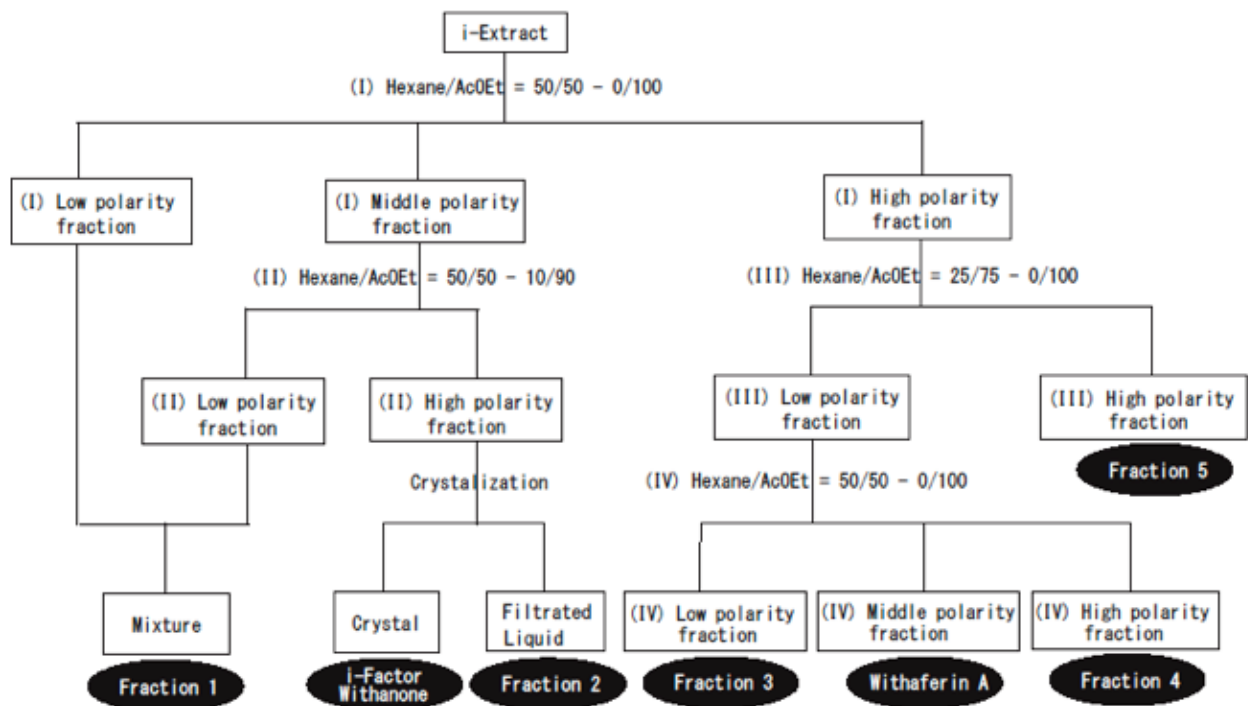


図3 Gene targets selected on the basis of shRNA library screening for induction of senescence in cancer cells

図 4(4)-3

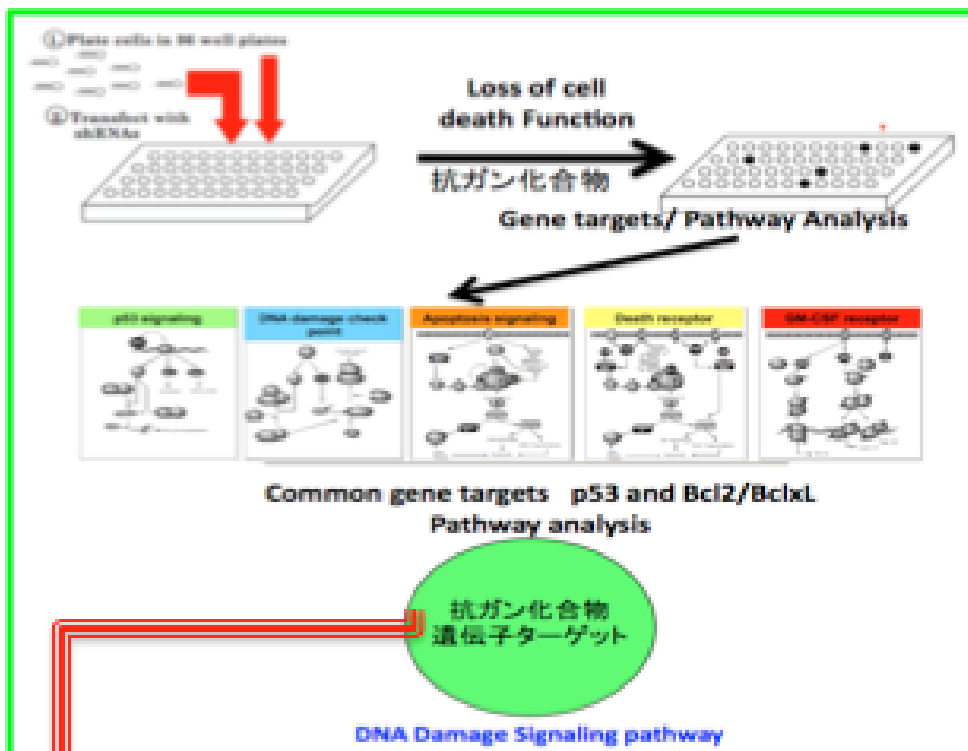


☒ 4(4)-4

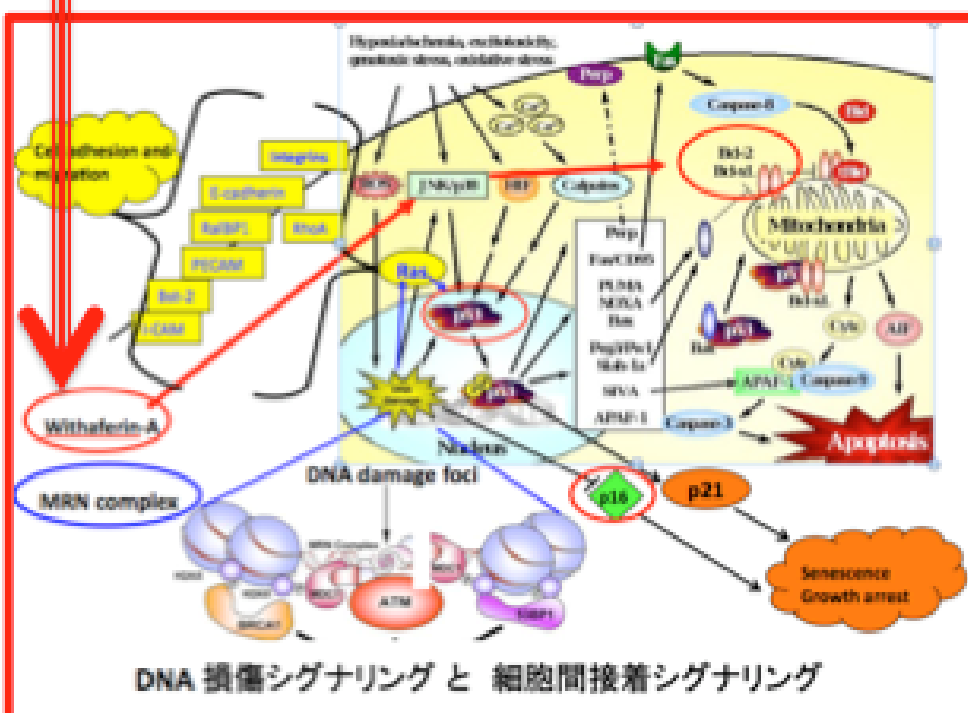


☒5 Fractionation of i-Extract by silica gel chromatography using silica gel column

☒ 4(4)-5

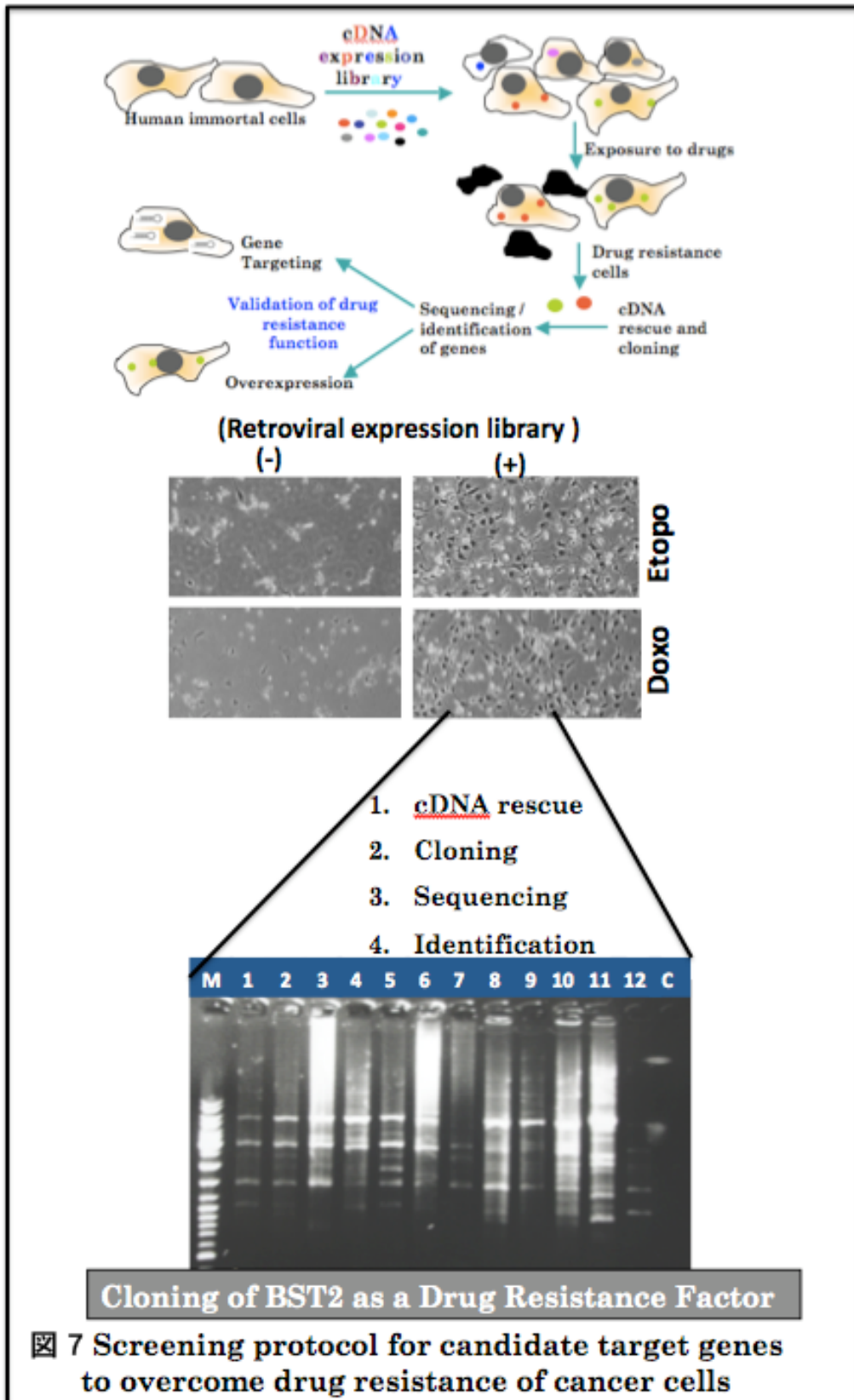


3



2

図6 Gene targets identified from selective killing of cancer cells hit p53 and Bcl2 components of DNA damage signaling pathway



☒ 4(4)-7

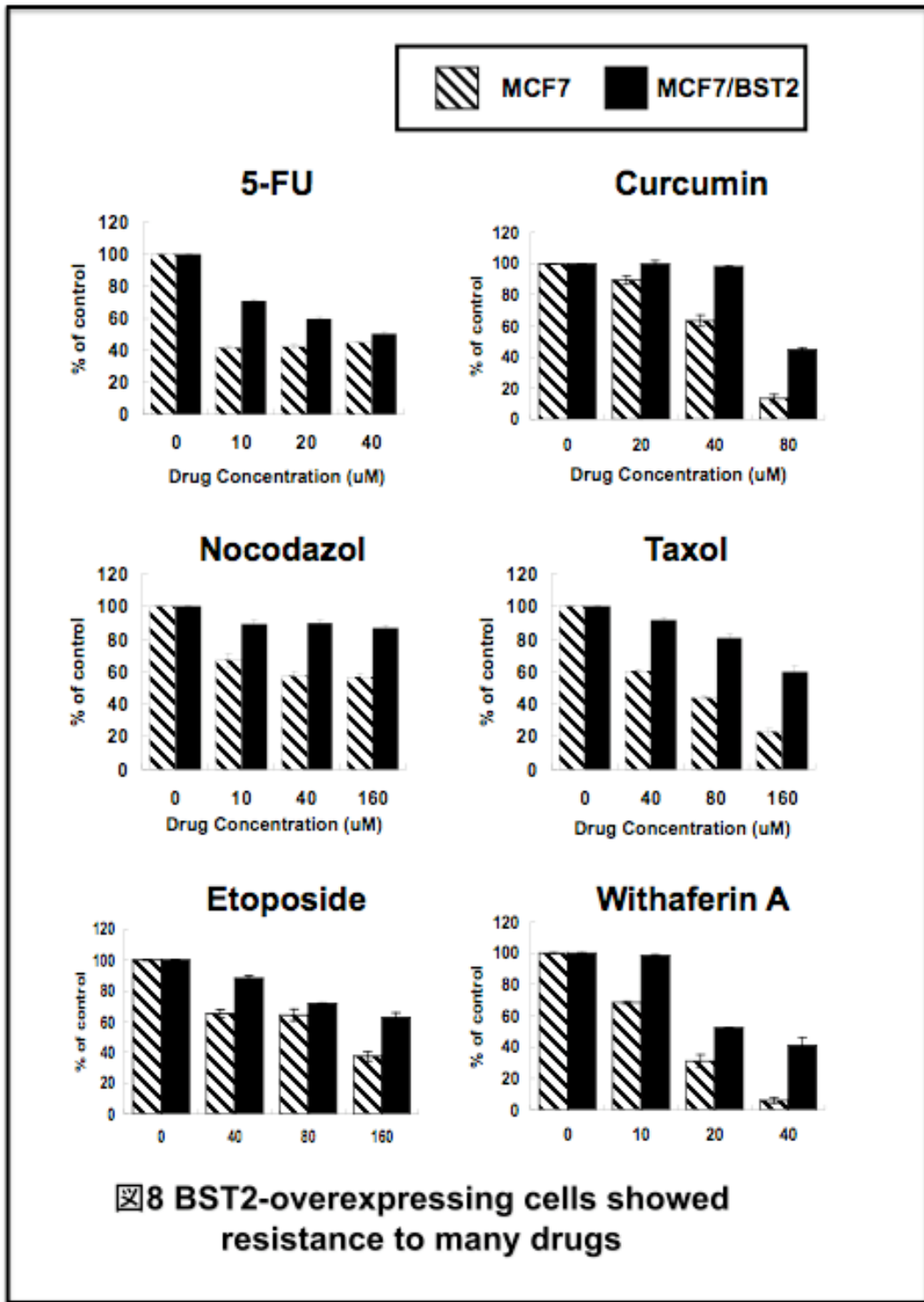


Figure 4(4)-8

圖 4(4)-9

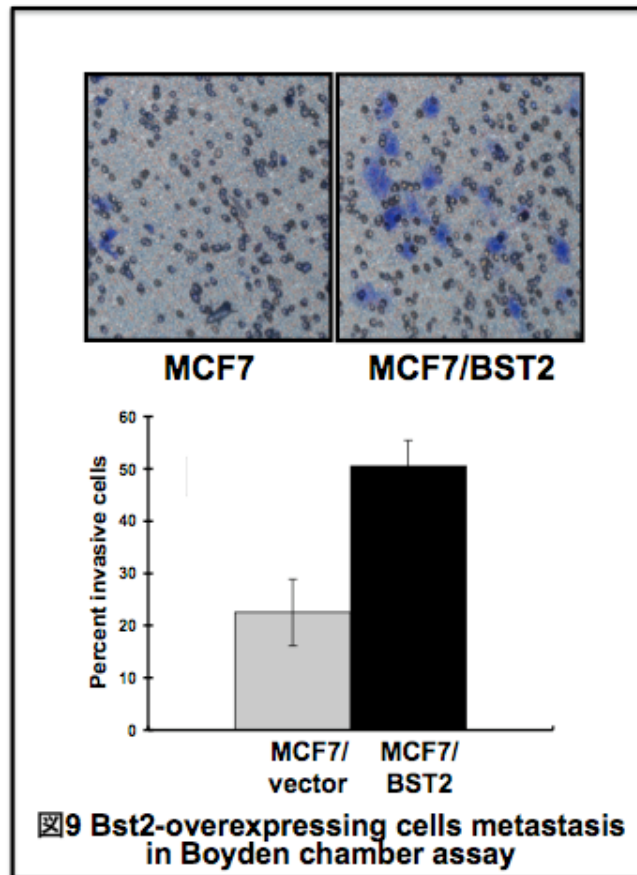
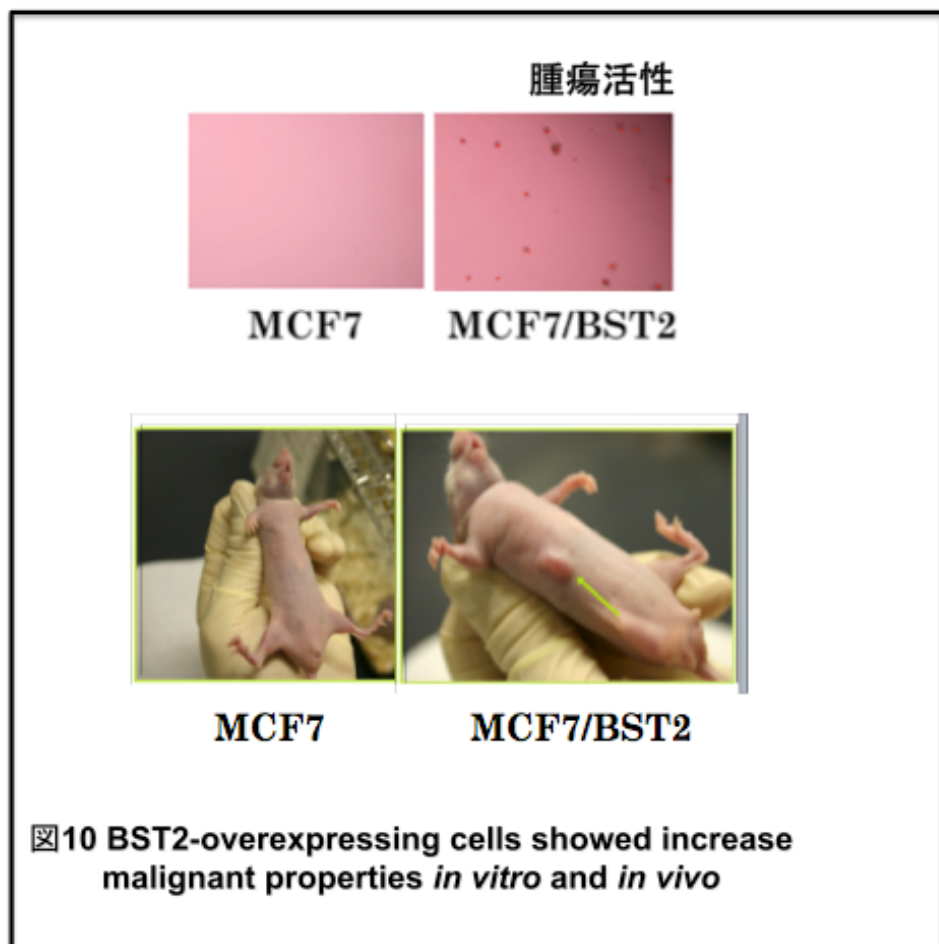
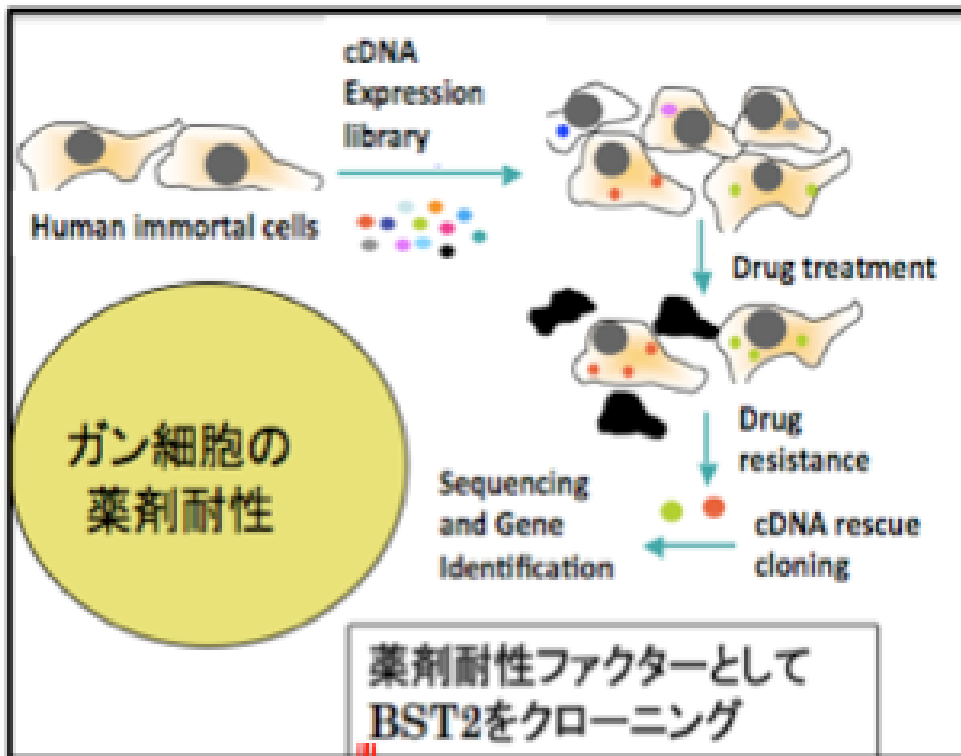
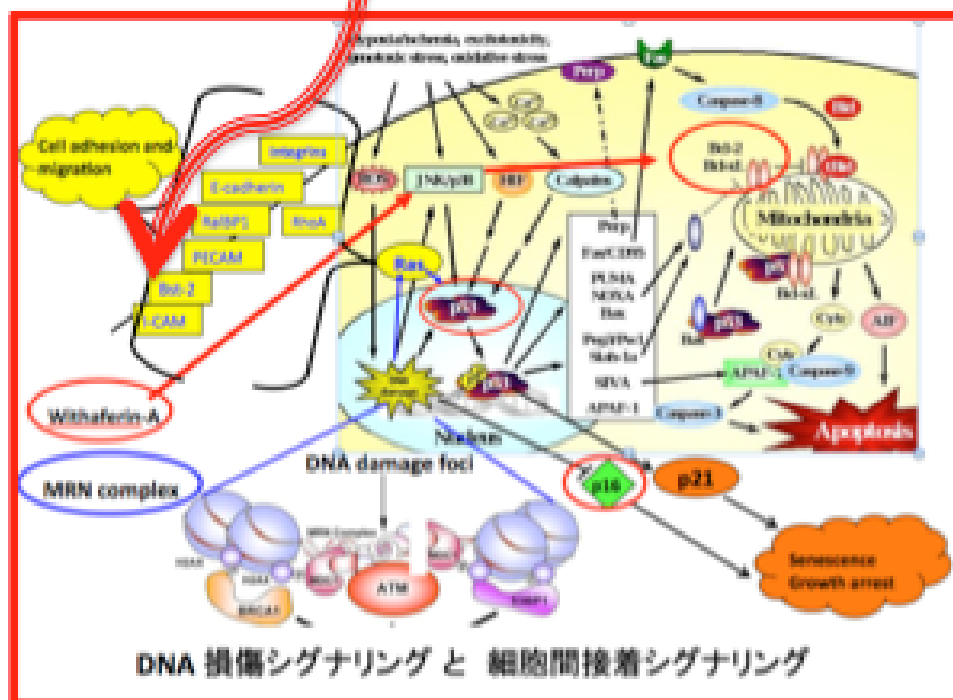


圖 4(4)-10





4



2

図11 Gene target identified for drug resistance of cancer cells hit cell adhesion regulatory component (BST-2) of the DNA damage response machinery.

図表
(第4章 4-2)

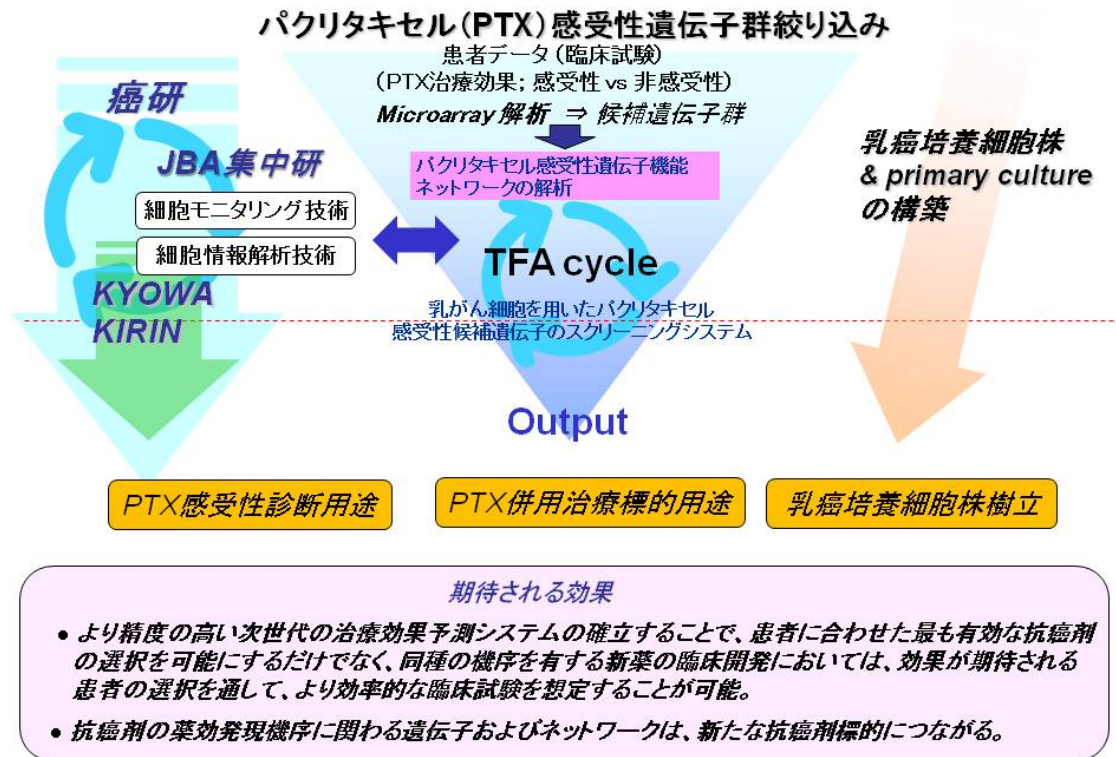


図 4(2)-1 創薬ターゲット同定技術ケーススタディー

従来の抗癌剤(化学療法)

ゲノム創薬以前の抗癌剤創薬

⇒ 殺細胞活性による化合物(=細胞毒)スクリーニング

- ◆ 代謝拮抗剤; 5FU、S1、Ara-C、Capecitabine、Gemcitabine など
- ◆ DNA作用薬; アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤 など
- ◆ 白金製剤; シスプラチン、カルボプラチン、オキザリプラチン など
- ◆ 微小管作用薬(細胞分裂阻害); ピンカアルカロイド、**タキサン**、エポシロン など

【臨床効果】腫瘍縮小

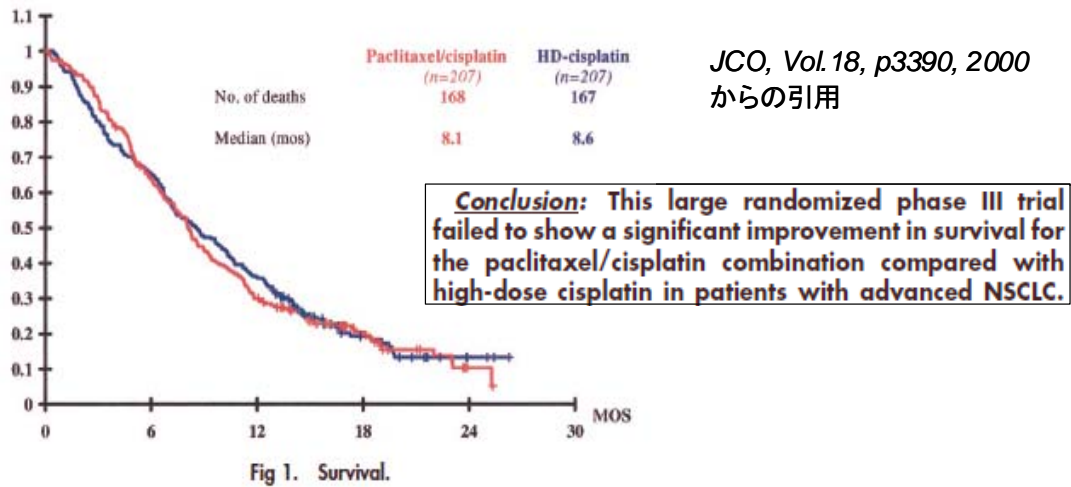
がん細胞の増殖を選択的に阻害するメカニズムでは無い

【課題】

- ・ 強い副作用
- ・ 単剤での効果には限界、薬剤耐性 ⇒ **多剤併用療法**

図 4(2)-2 ゲノム創薬以前の抗がん剤創薬

Phase III Comparative Study of High-Dose Cisplatin Versus a Combination of Paclitaxel and Cisplatin in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer



大規模臨床試験で併用療法のメリットが示せなかったケース
⇒ 化学療法剤カクテル療法開発の限界？

図 4(2)-3 20 世紀の化学療法併用開発の一例

ゲノム創薬・分子標的薬

がん細胞で発現している標的分子、
がんの増殖、生存に関与する遺伝子産物
(がん遺伝子やそのシグナル関連因子)を標的とした薬剤開発

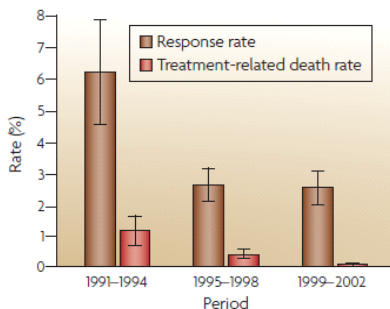
- ◆ がん細胞表面抗原や分泌因子中和を標的とする抗体医薬

Rituxan(CD20)、Herceptin(Her2)、Erbix(EGFR)、Avastin(VEGF)

- ◆ 標的蛋白への結合、酵素アッセイ、
標的分子発現細胞に対する選択的抗細胞などを指標にした
High Throughput Screening 等による低分子医薬開発(主
にキナーゼ阻害剤)

**Gleevec(Bcr-Abl)、Tarceva(EGFR)、Iressa(EGFR)、Tykerb(Her2)、
Nexavar(KDR マルチキナーゼ)、Sutent (KDRマルチキナーゼ)
Velcade(proteasome)、Torisel(mTOR)**

図 4(2)-4 ゲノム創薬、分子標的創薬時代の抗がん剤



NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
VOLUME 6 | FEBRUARY 2007

Phase I (単剤)での
毒性軽減しているが
腫瘍縮小の薬効は弱い

	標準治療として用いられている化学療法	併用される分子標的薬
大腸癌	5FU Capecitabine Oxaliplatin	Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Panitumumab EGFR
乳癌	Docetaxel, Paclitaxel Doxorubicin, Epirubicin Cyclophosphamide Fluorouracil Gemcitabine Capecitabine Vinorelbine	Trastuzumab Her2 Lapatinib Her2
非小細胞肺癌	Cisplatin, Carboplatin Vinorelbine Etoposide Docetaxel, Paclitaxel Gemcitabine Vinblastine Pemetrexed Irinotecan Ifosfamide Mitomycin	Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Erlotinib EGFR

NCCNガイドラインより抜粋

- ✓ 単剤での効果には限界
- ✓ 最終的には既存薬との併用で使われるケースが多い
- ✓ 分子標的薬どうしの併用も今後の課題

図 4(2)-5 分子標的薬と既存抗がん剤併用の現状

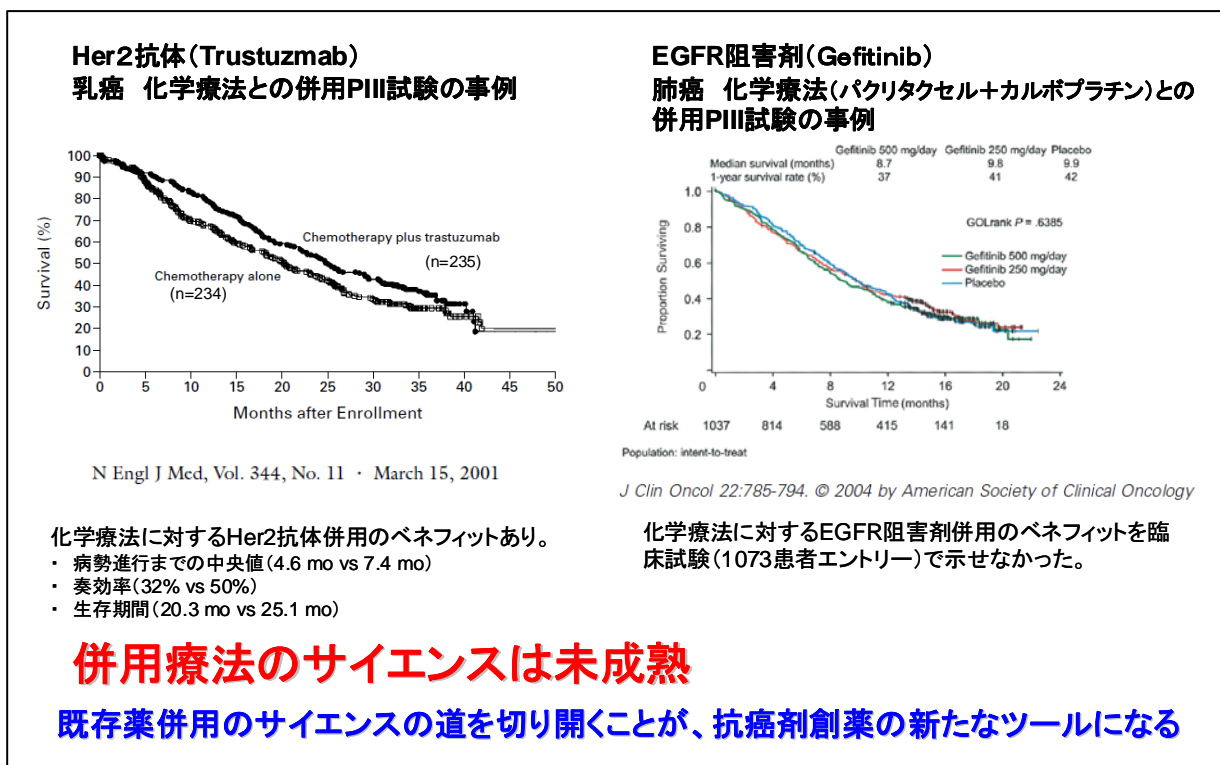
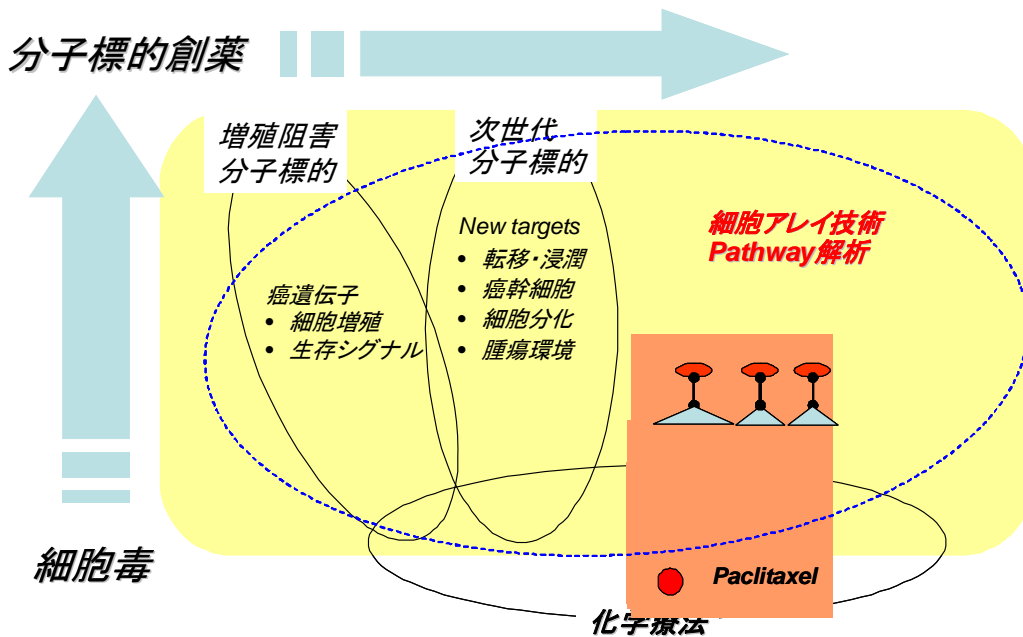


図 4(2)-6 分子標的薬と既存抗がん剤併用療法開発の現状



既存化学療法 (Paclitaxel) 応答性に関与する新たな pathway からの展開可能性
⇒ 患者選択、併用のラショナル

図 4(2)-7 抗がん剤創薬から見た本プロジェクトの位置付け

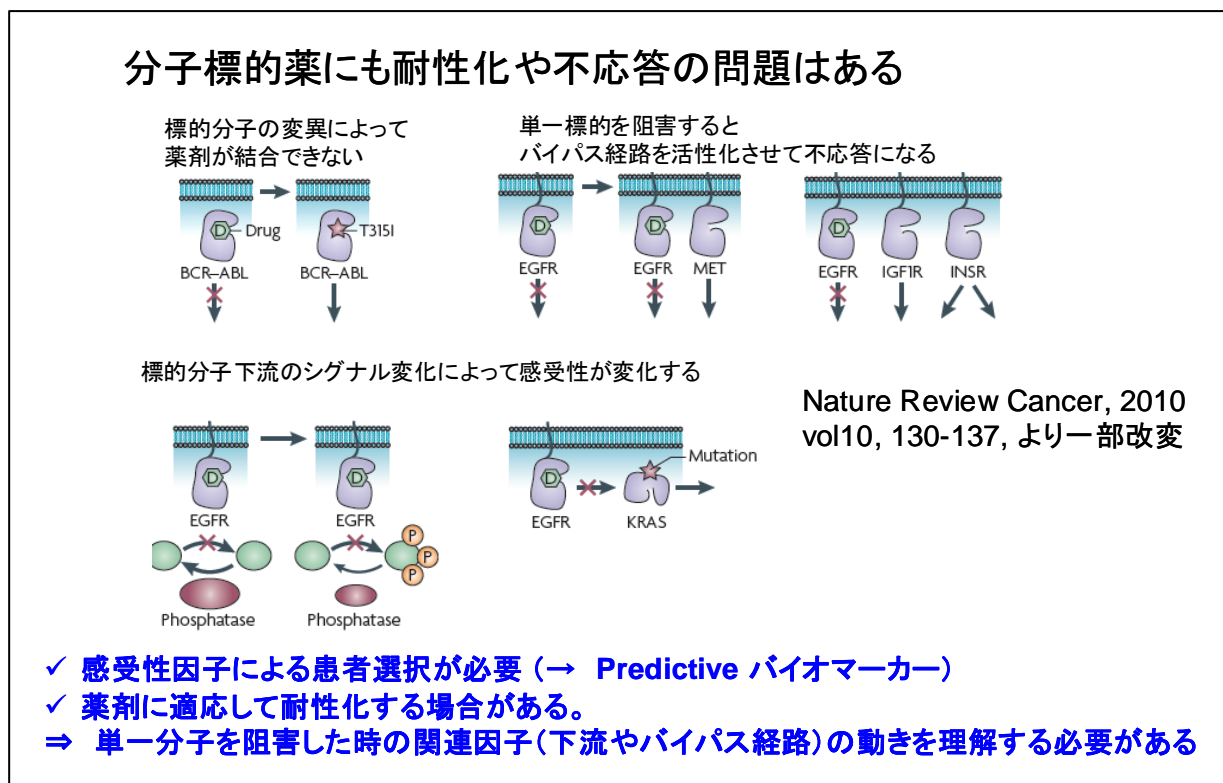


図 4(2)-8 分子標的療法に対する不応答、薬剤耐性

(パクリタキセル感受性遺伝子機能ネットワークの解析)

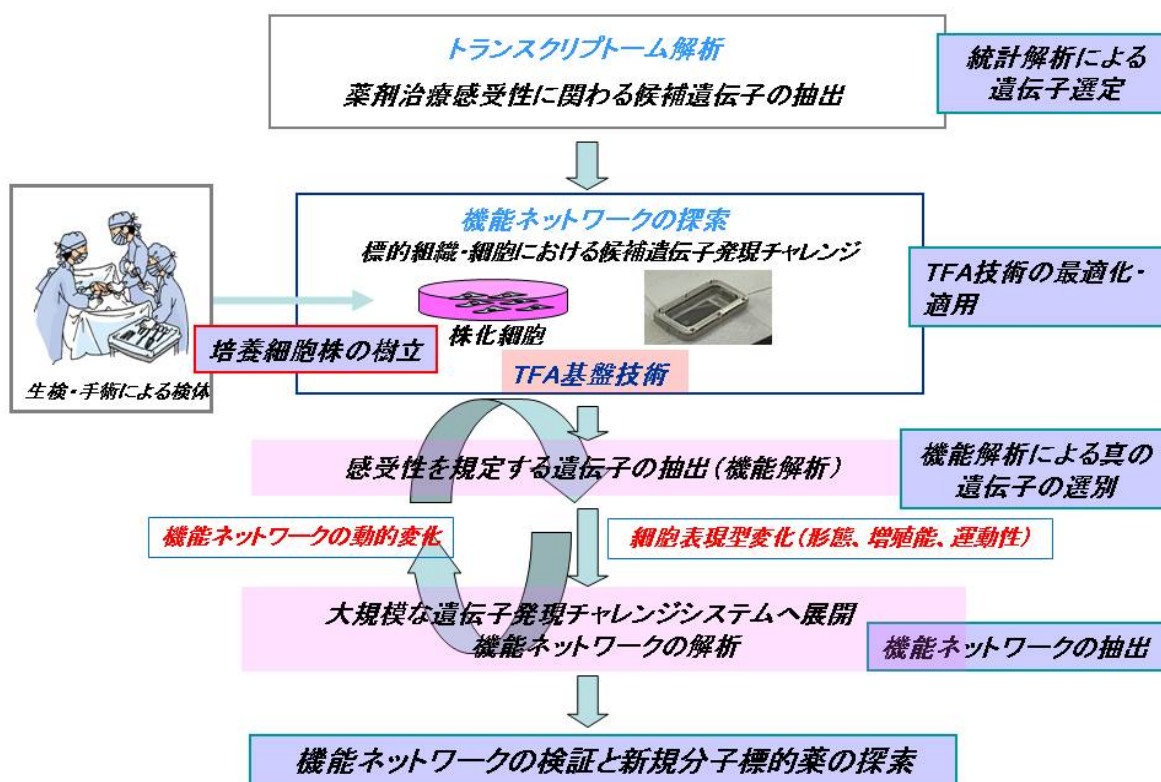


図 4(2)-9 セルアレイを用いた機能ネットワーク検証システム

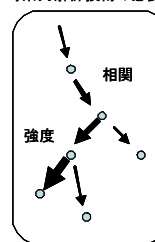
既存薬の効果を増強する併用分子標的創薬への試み

- 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は重要な課題。

薬剤併用時の細胞内の動的なパスウェイに作用するものを見出す方法論の確立

- 併用薬の最適な組み合わせのサイエンスは未成熟の領域。
- 患者組織や細胞株のスナップショット的な投与前遺伝子解析では、薬剤併用時の細胞内シグナルの動き(動的プロファイル)が加味されていない。
- 細胞の中で起こる併用薬剤に応答する分子間の相互関係や、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や方法論が必要。

時系列解析技術の必要性



単純なネットワーク議論ではなく、細胞内の分子状態を統合的に表現する方法を探索する。細胞の物理的予測評価技術への発展を将来的に引き続き検討する。



N次元要素(遺伝子、パスウェイ、時間)からなる状態

多次元的な解析による高次元細胞像の理解

細胞機能解析、細胞時系列解析を総合的に組み合わせた日本発の新たな創薬アプローチ

図 4(2)-10 本研究の意義とプロジェクト内での位置付け

対象

◆ 選択条件

- 病理学的に浸潤癌であることが確認された浸潤径 3 cm以上の Stage II a～III b原発性乳癌
- ≤ 70 才、PS: 0～1
- 骨髄・肝・腎 機能が十分保たれている
- (WBC≥4000、Plat. ≥10万、Hb≥10、GOT/GPT<60/70)
- その他重篤な合併症を認めない
- 文書で同意が得られている

◆ 除外条件

- 前治療歴がある
- 妊娠の希望がある

治療法

パクリタキセル単剤： 80m g / m² の週1回、12回投与（3ヶ月）

図 4(2)-11 術前化学療法（臨床試験）の対象症例

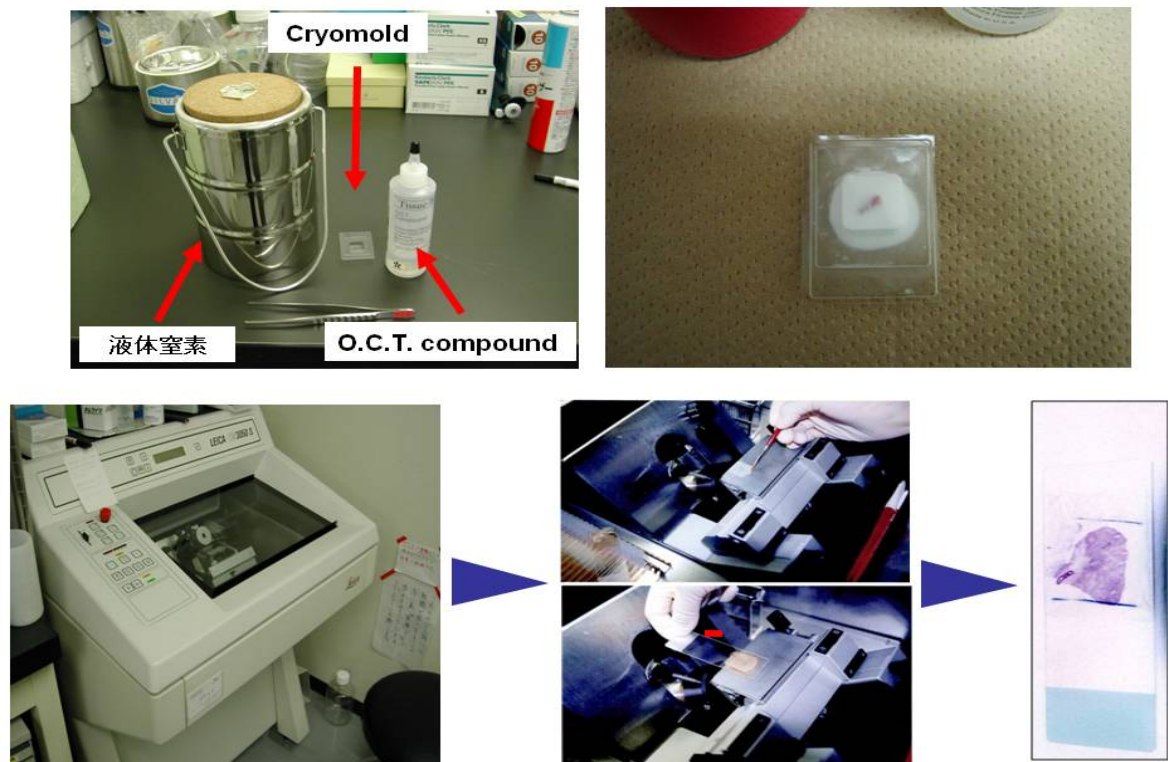
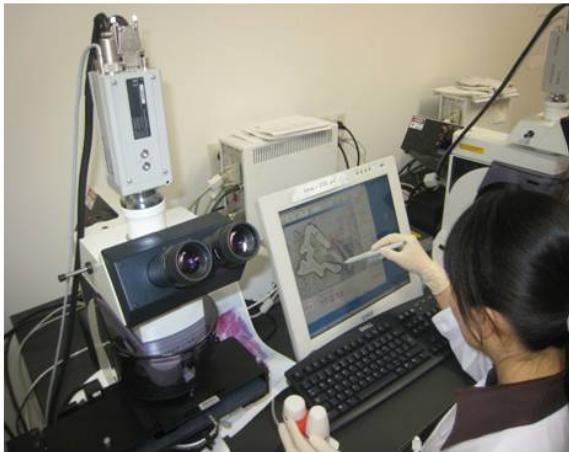
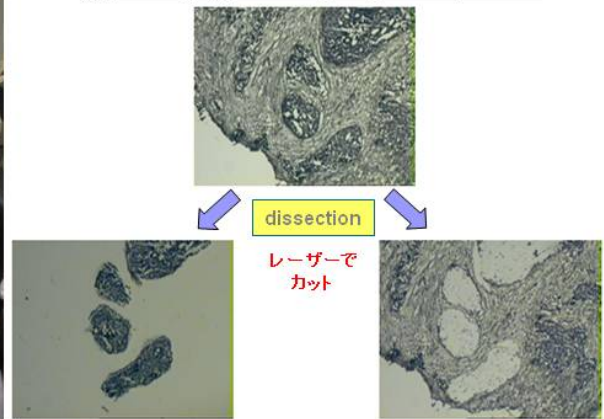


図 4(2)-12 採取した組織の包埋と薄切

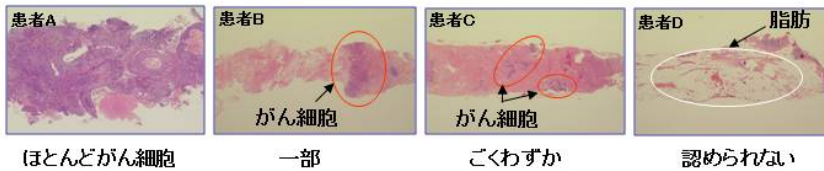


乳がん細胞のマイクロダイゼクション



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ので、間質を避け**選択的にがん組織を採取** マイクロアレイによる発現解析にはおおよそ一万個の細胞が必要

乳がん患者から針生検(12G)で採取された組織



がん細胞の含まれる割合は大きく違う

図 4(2)-13 Laser beam Microdissection によるがん細胞の採取

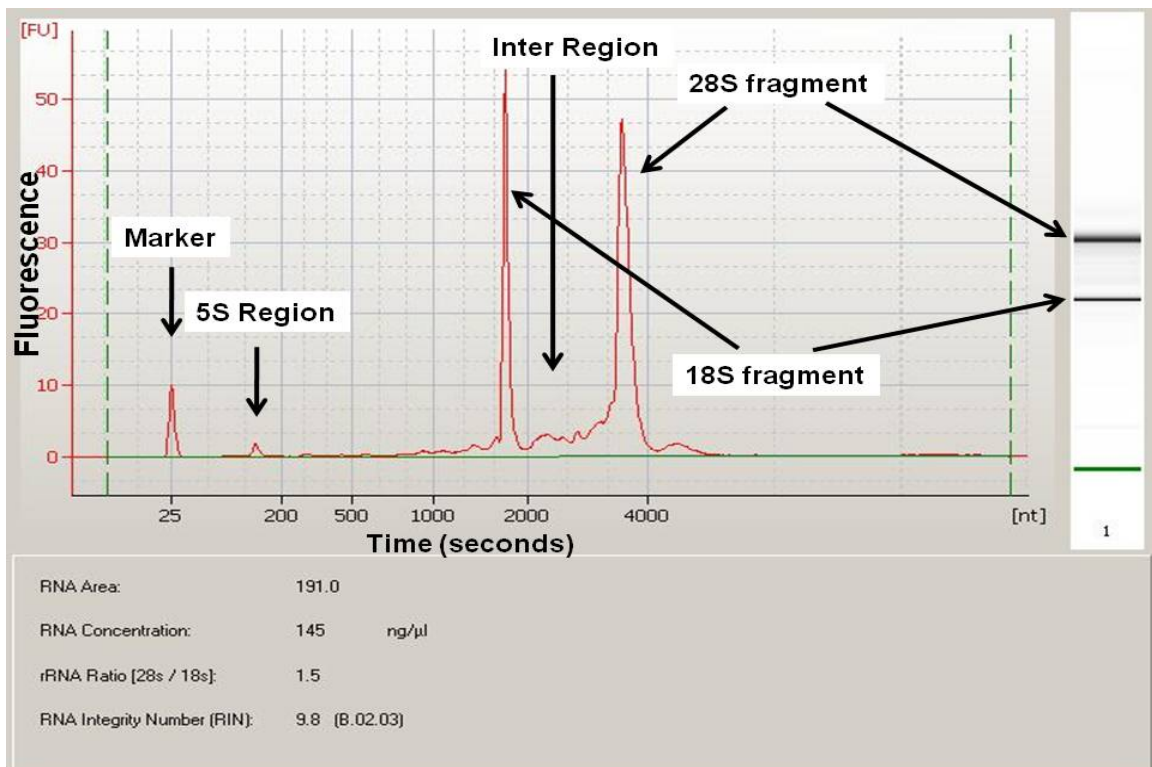


図 4(2)-14 バイオアナライザーによる RNA の質の評価

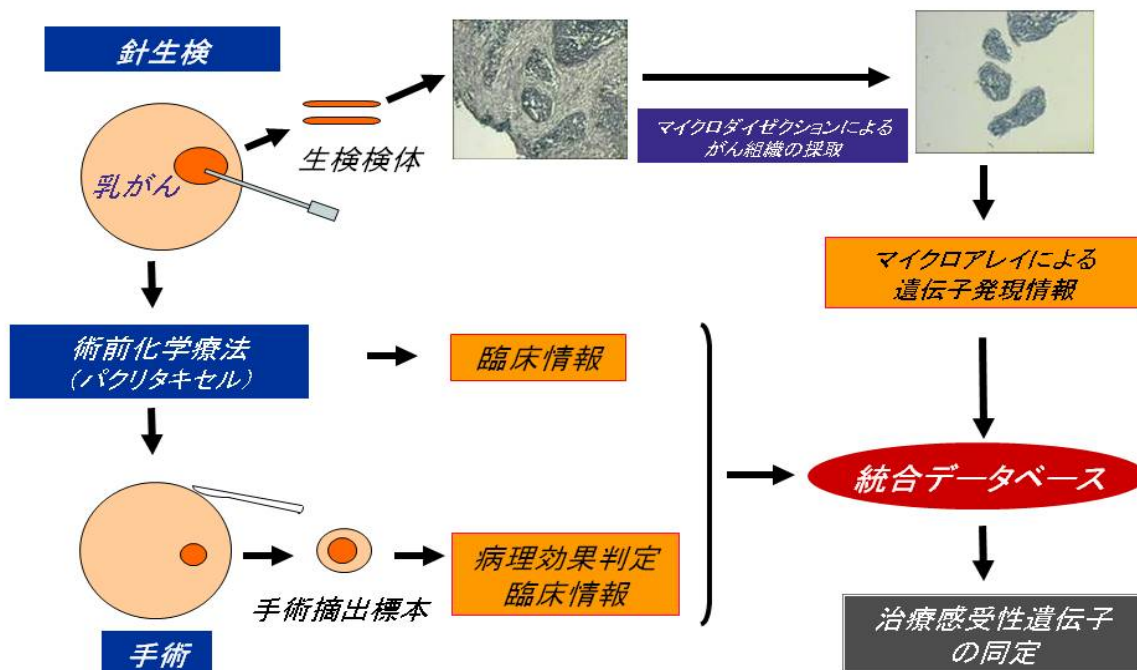


図 4(2)-15 乳がん術前抗がん剤感受性予測に関する臨床試験

パクリタキセルの治療効果判定結果

病理効果

無効群			有効群		計
0	1a	1b	2	3	
7	15	6	11	1	40

Grade0 = 無効

Grade1a = 約1/3未満の癌細胞に高度の変化、

Grade1b = 約1/3～2/3未満の癌細胞に高度の変化

Grade2 = 約2/3以上の癌細胞に高度の変化

Grade3 = 全ての癌細胞が壊死、あるいは消失

図 4(2)-16 術前パクリタキセル治療による病理学的効果判定

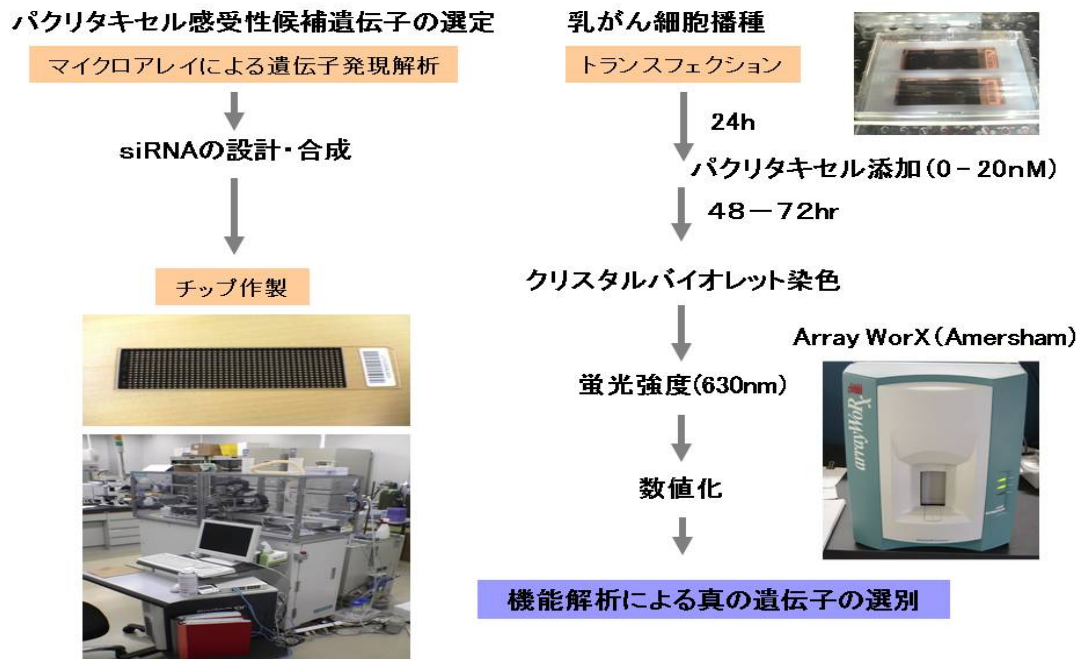


図 4(2)-17 乳がん細胞を用いた抗がん剤感受性遺伝子の発現チャレンジシステム

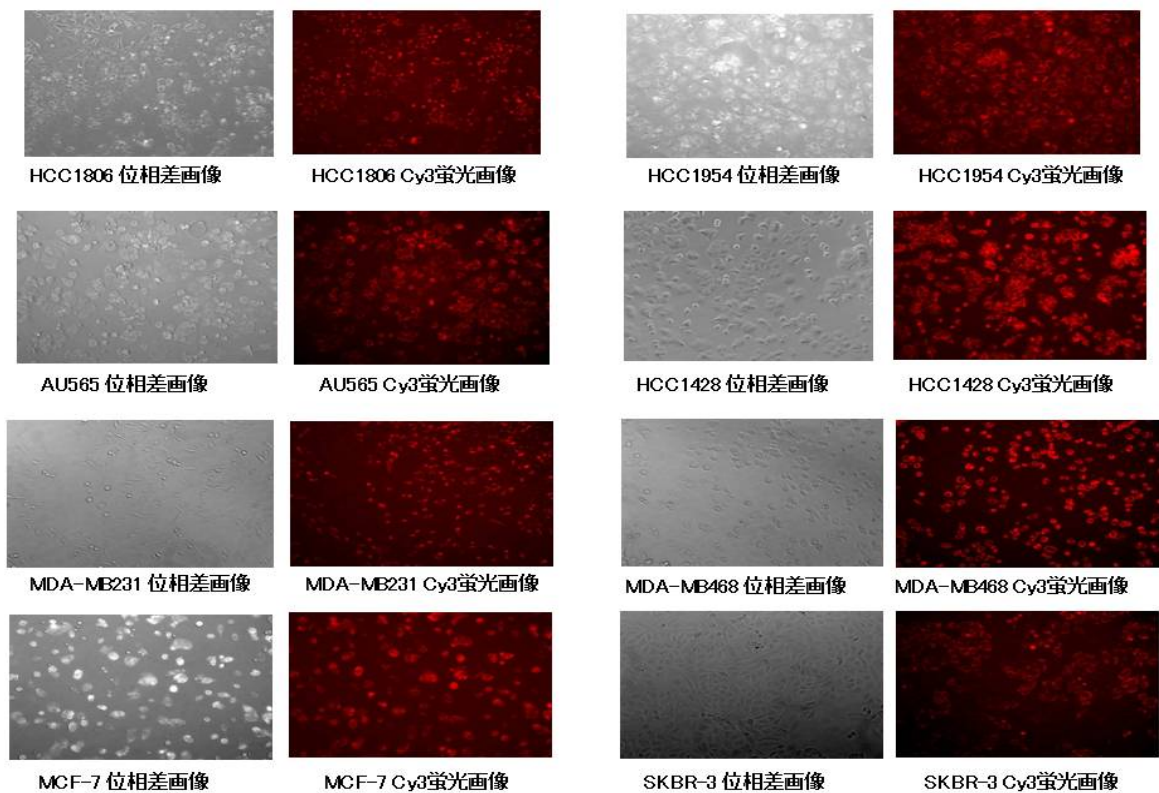


図 4(2)-18 各種乳がん培養細胞株における siRNA の取り込み効率

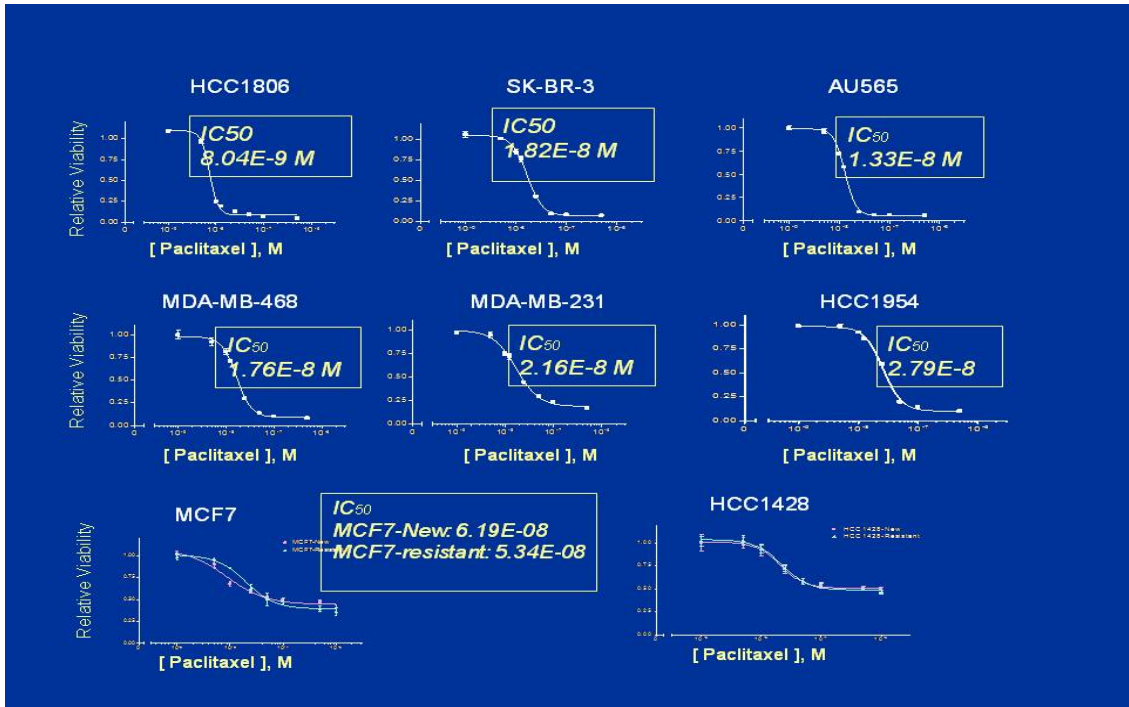


図 4(2)-19 各種乳がん培養細胞におけるパクリタキセル感受性

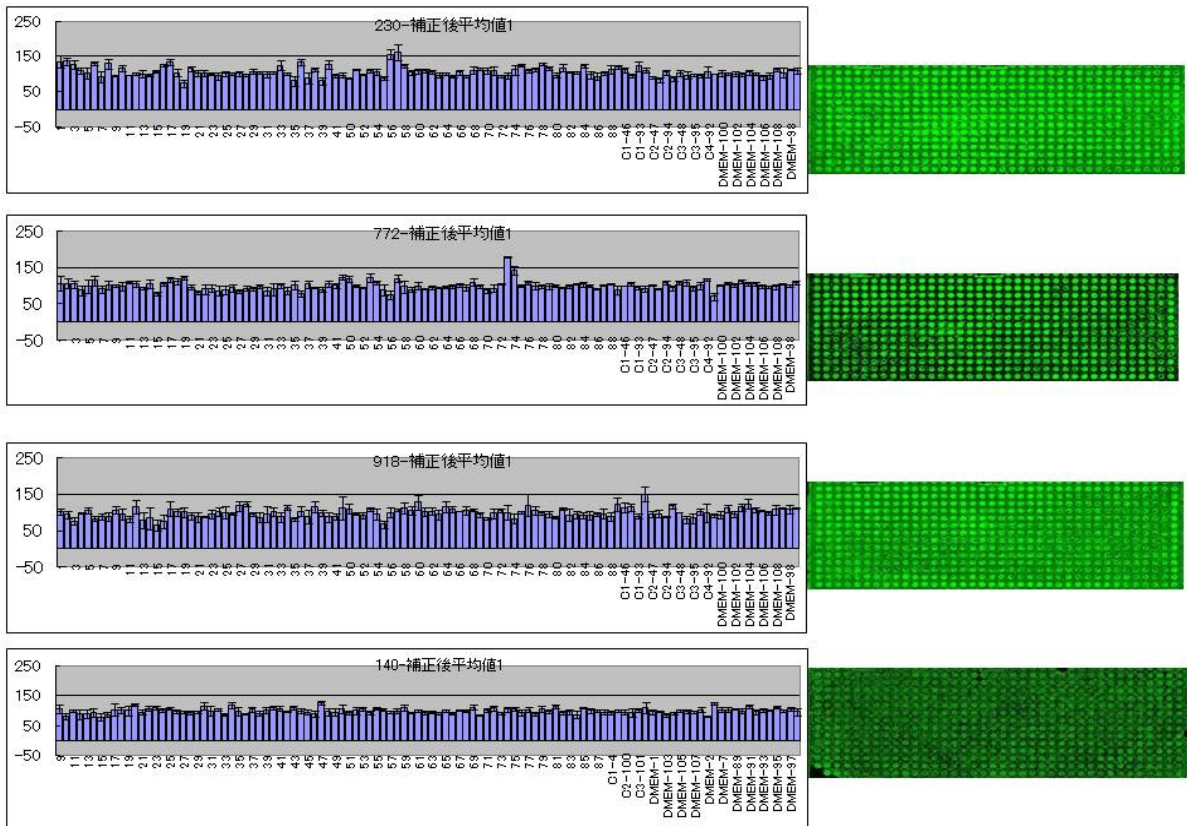


図 4(2)-20 セルアレイ解析による細胞生存率の測定

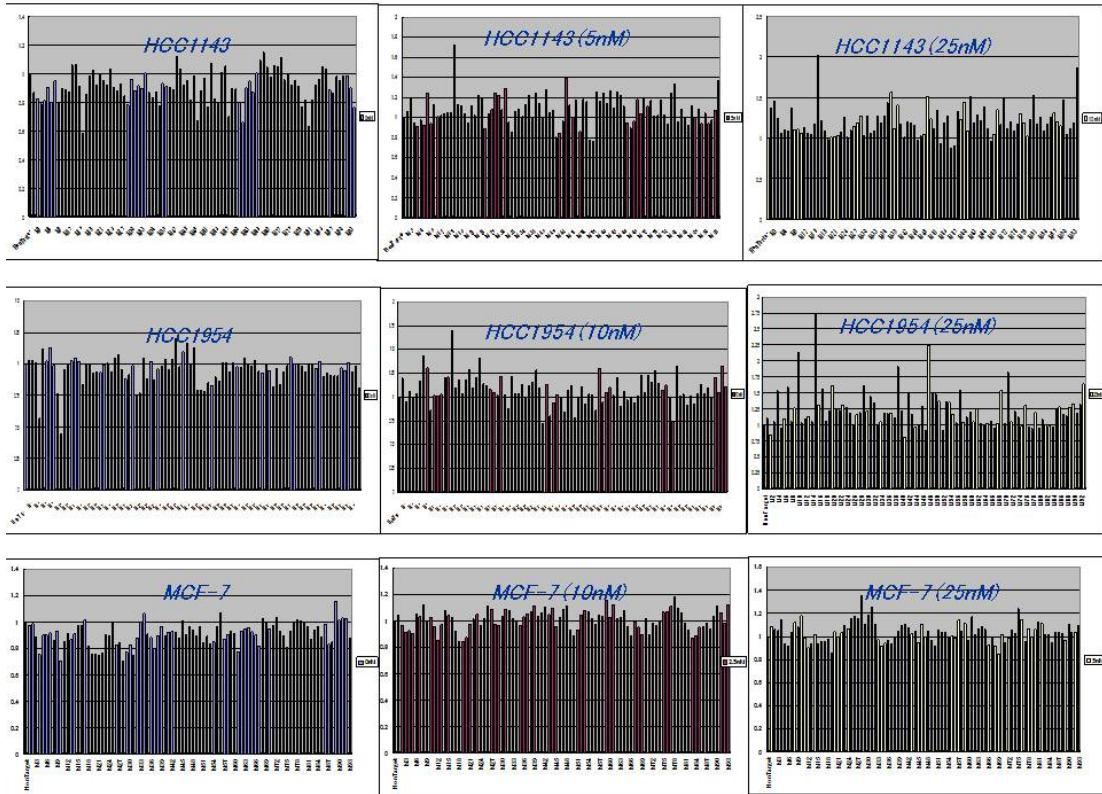


図 4(2)-21 細胞の生死への遺伝子ノックダウンの影響

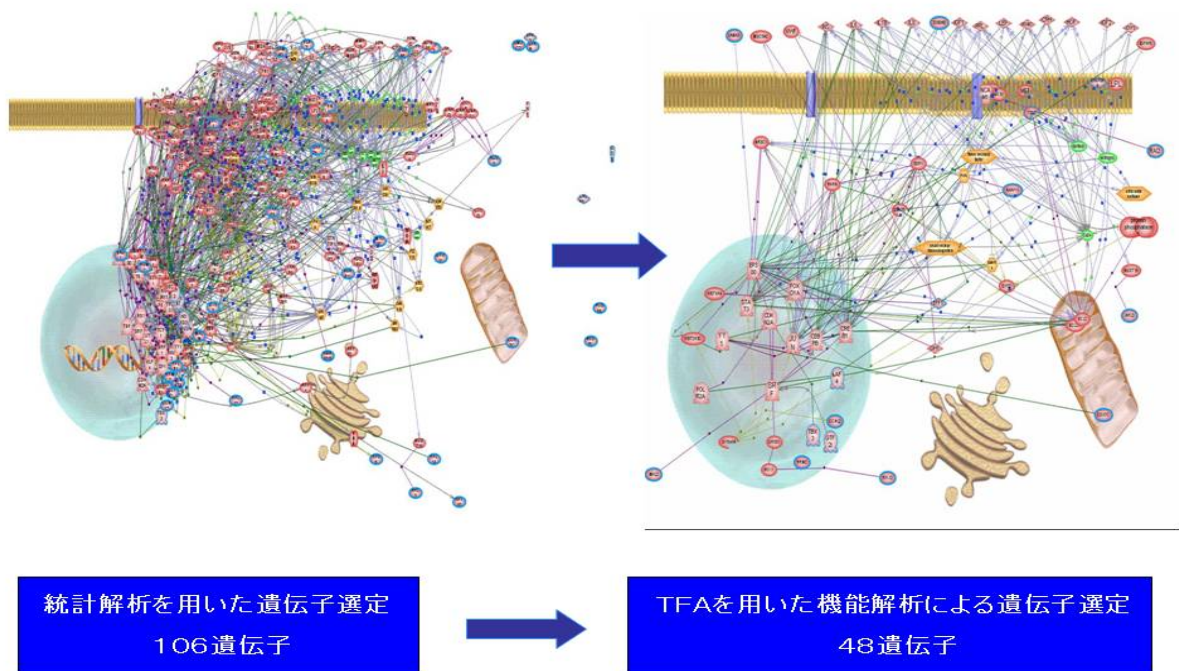


図 4(2)-22 候補遺伝子のネットワーク解析

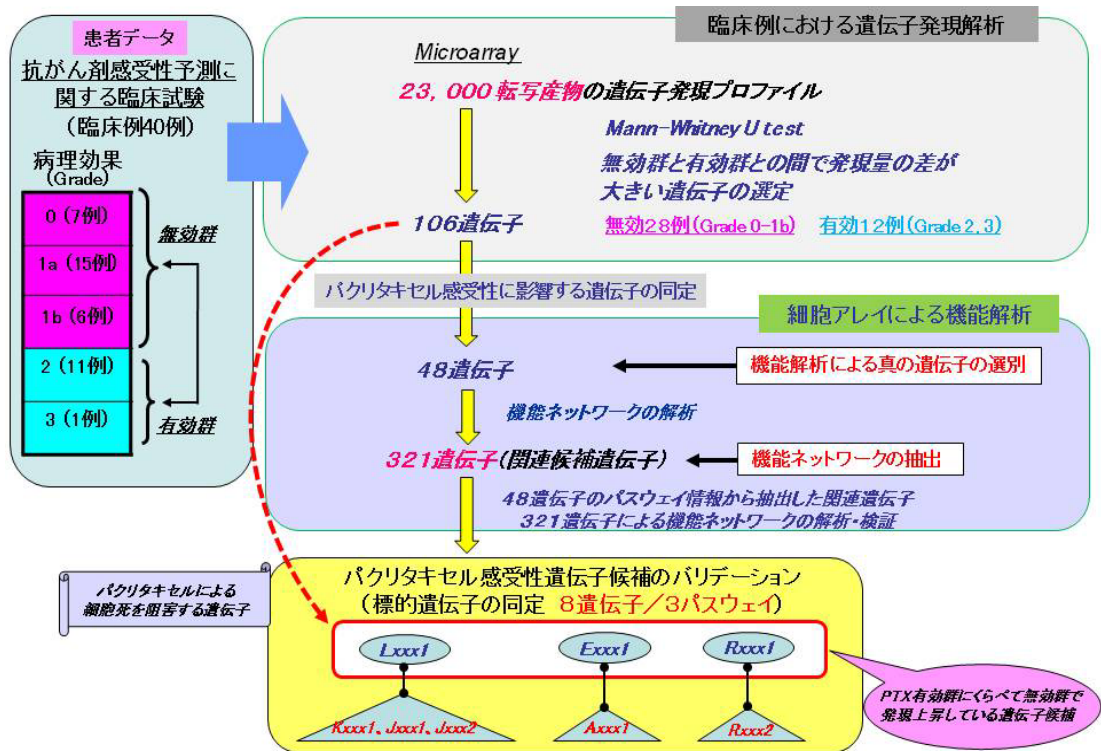


図 4(2)-23 パクリタキセル感受性遺伝子の同定

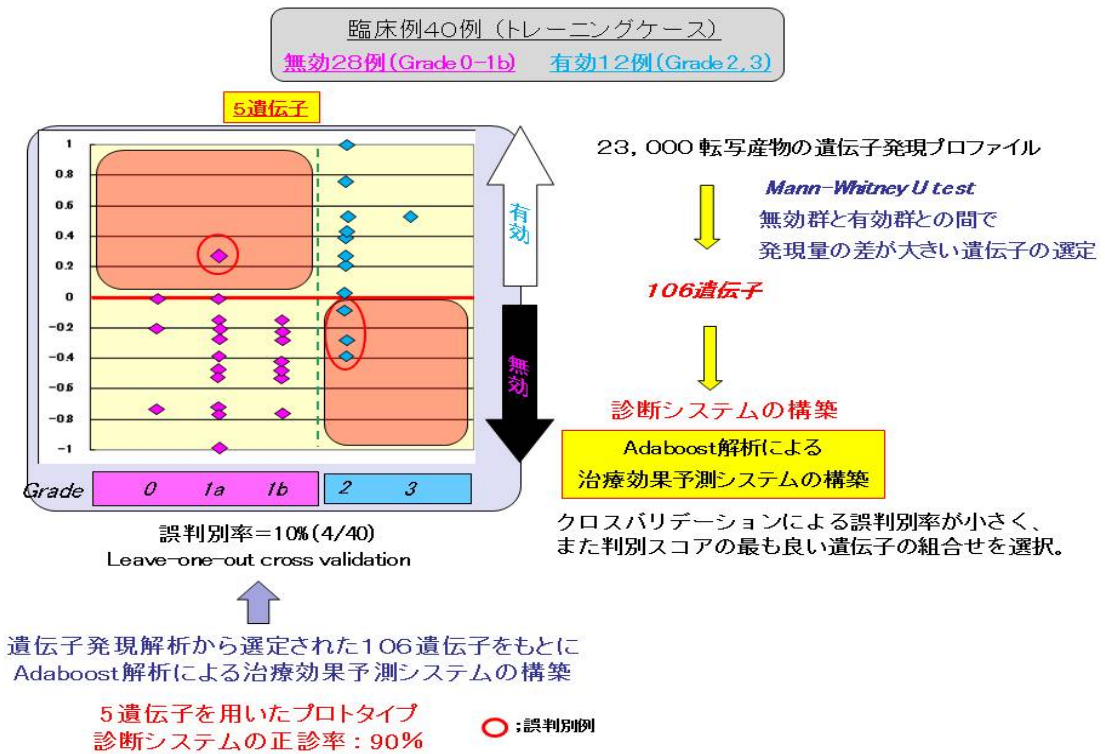


図 4(2)-24 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (従来法)

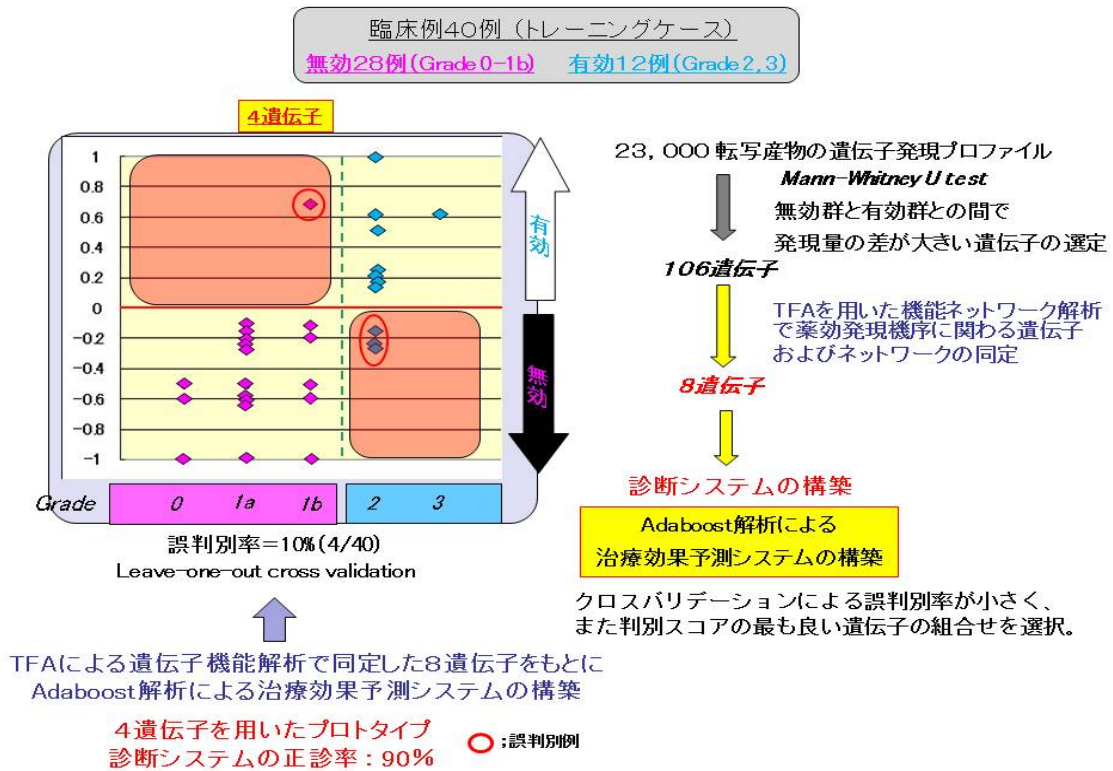


図 4(2)-25 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (セルアレイ解析による遺伝子)

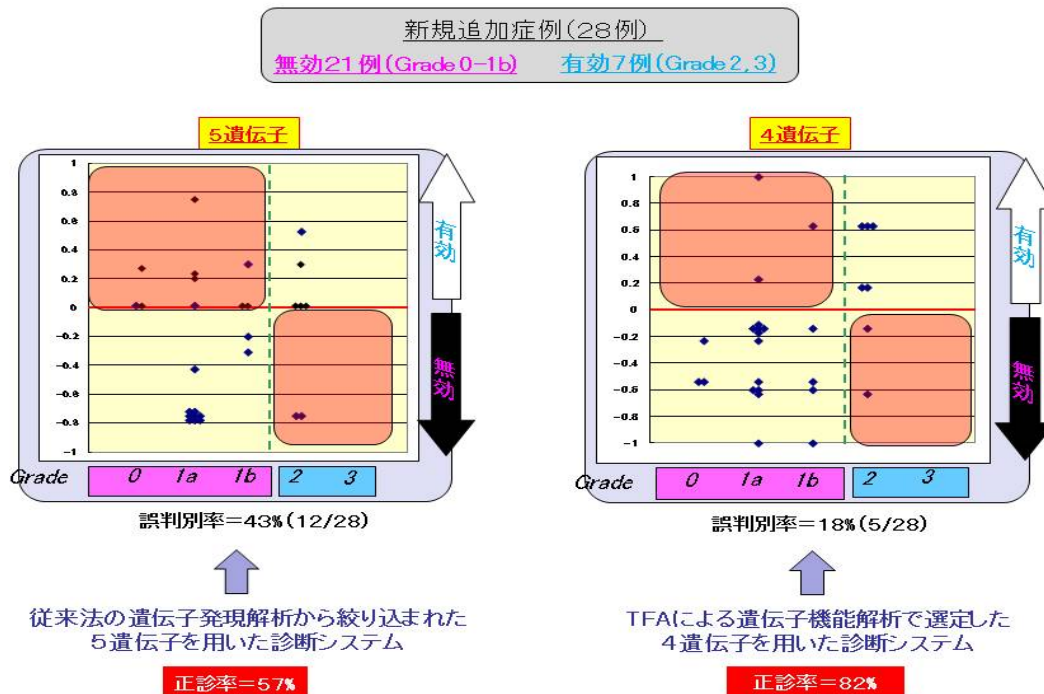


図 4(2)-26 パクリタキセル治療効果予測システムの検証

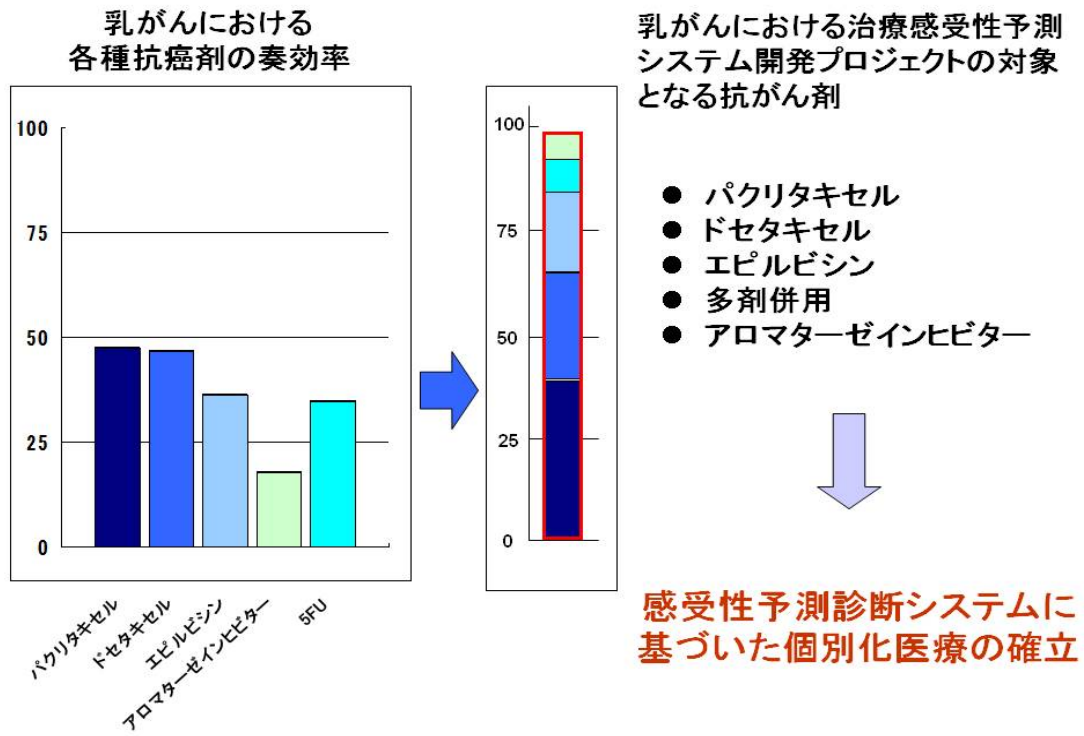


図 4(2)-27 がんの個性に基づいた最も有効な抗がん剤の選択を可能にするシステムの構築

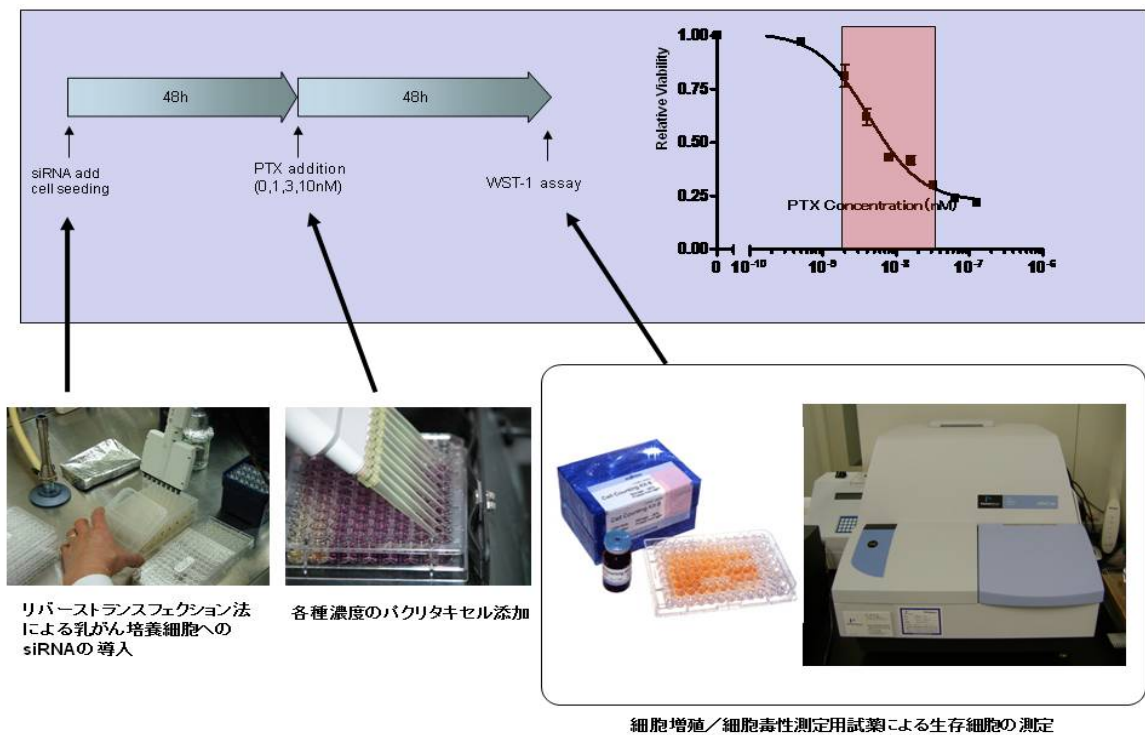


図 4(2)-28 ウェルベース (96 穴プレート) を用いた検証実験

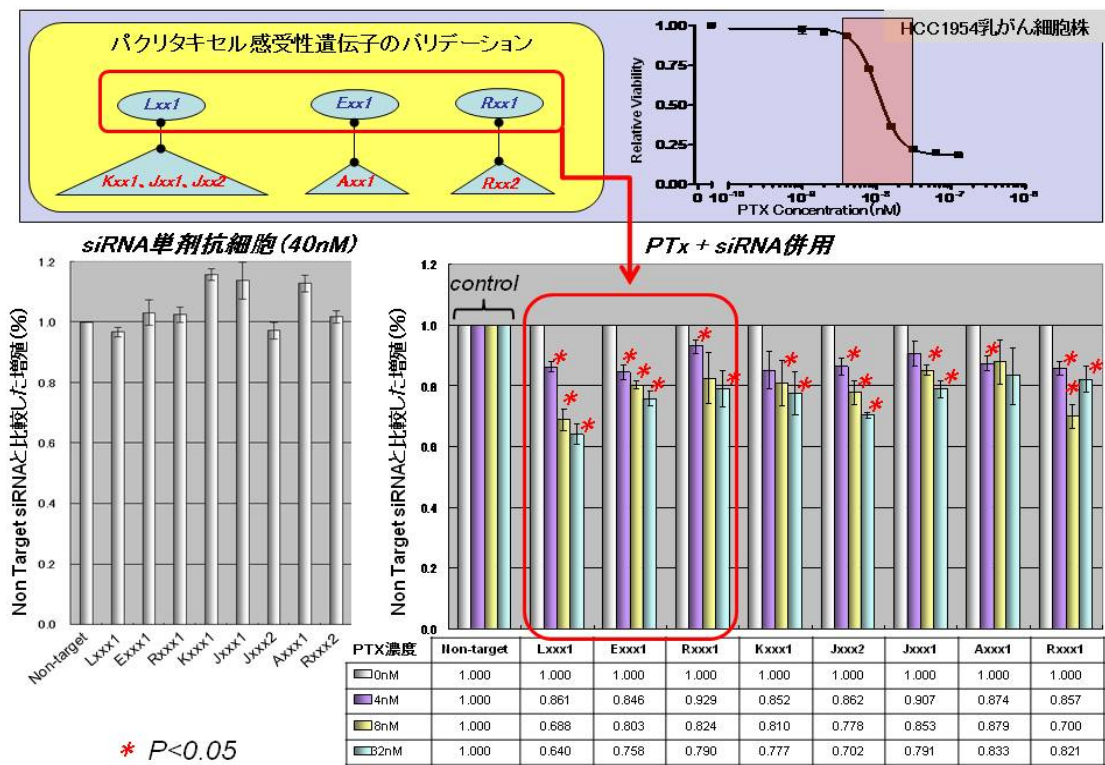


図 4(2)-29 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (1)

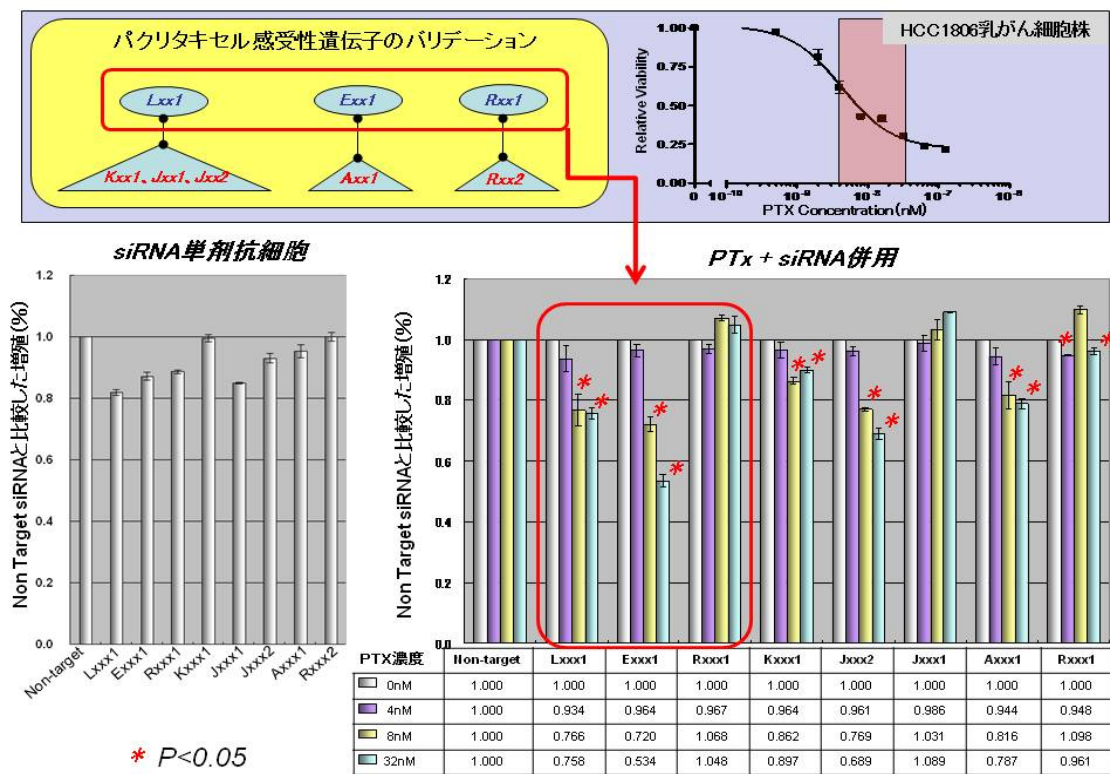


図 4(2)-30 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (2)

— HCC1954乳がん細胞株—

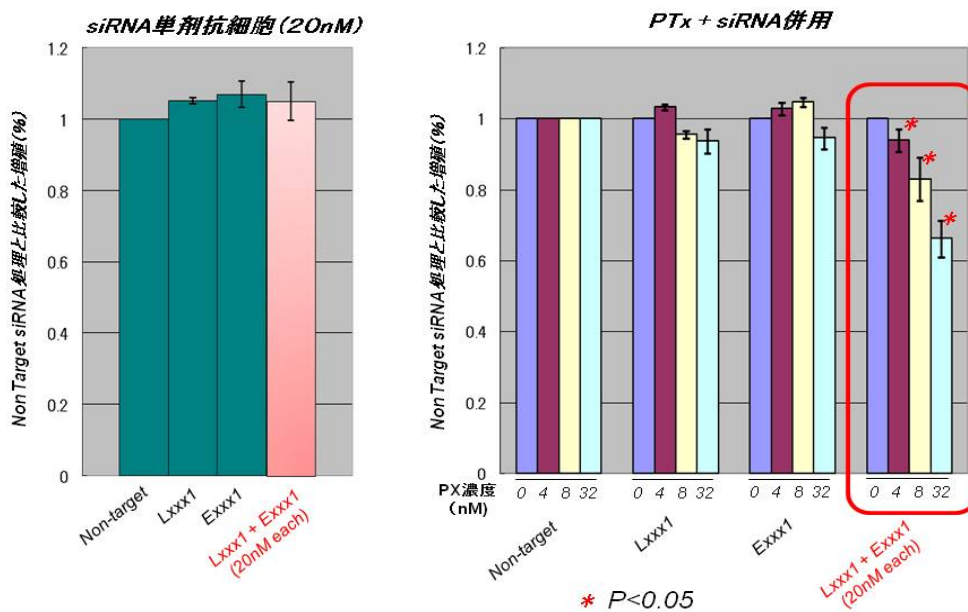


図 4(2)-31 複数パスウェイの組み合わせ阻害によるパクリタキセル感受性増強効果の検証

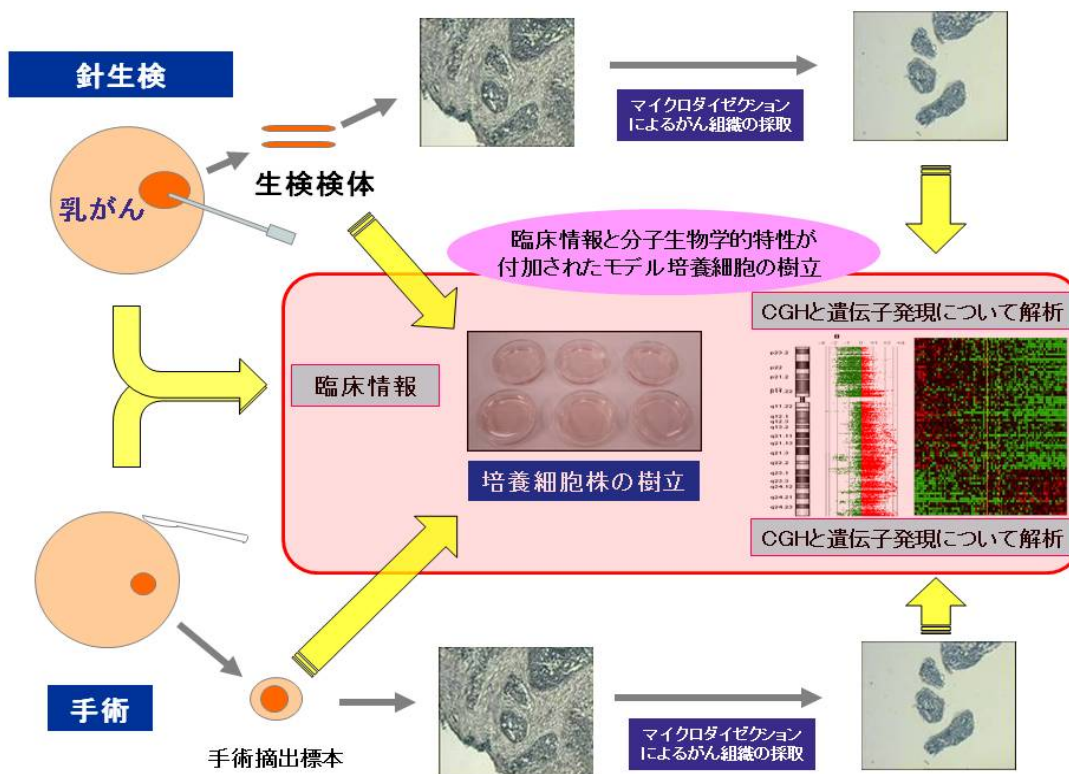
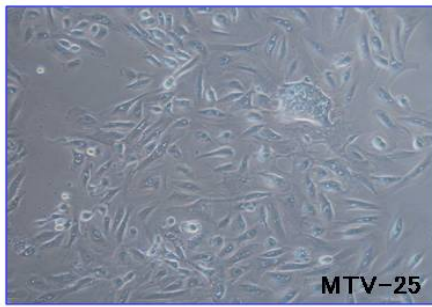
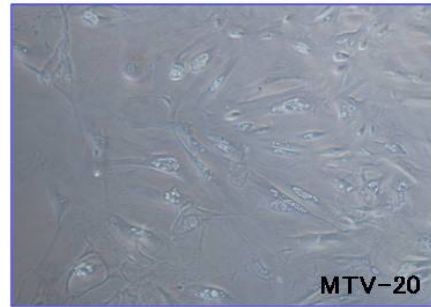


図 4(2)-32 乳がん培養細胞株の樹立

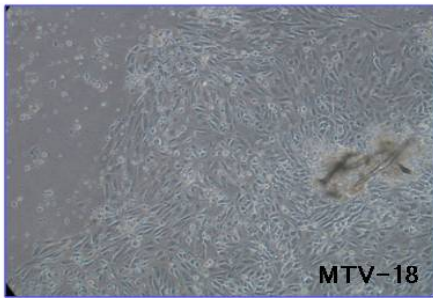
乳がん培養細胞株(MTV-25/10日目)



乳がん培養細胞株(MTV-20/3週目)



乳がん培養細胞株(MTV-18/5週目)



乳がん培養細胞株(MTV-15/9週目)

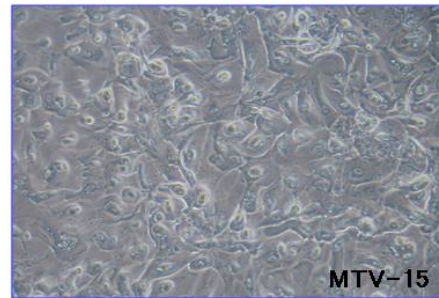
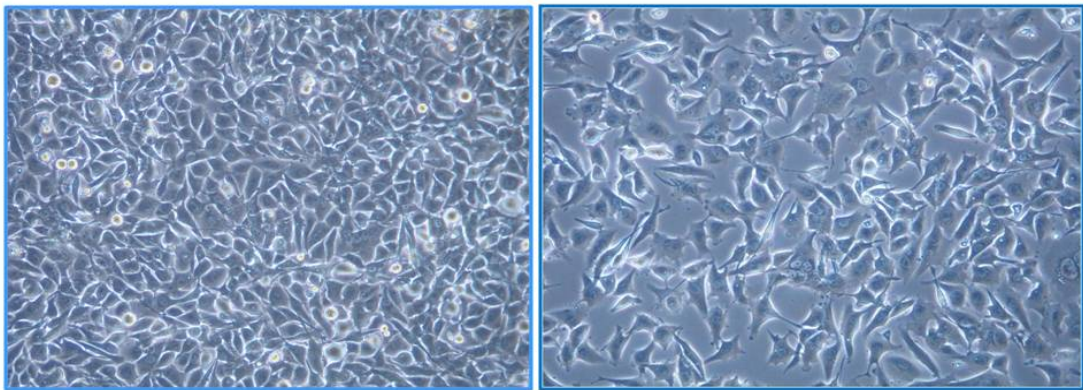


図 4(2)-33 針生検サンプルからの初代培養細胞



臨床材料: 右乳房

病理診断: Partial mastectomy Ad-Ca, solid-tub rt brest
(充実性腺管がん)

リンパ節転移: 0/9

形態: 細長い突起を有する不整形な細胞形態を示す。増殖は早い

特徴: 針生検材料でHER2,ER,PgR negative
細胞株HER2,ER,PgR negative

図 4(2)-34 トリプルネガティブ乳がん培養細胞株

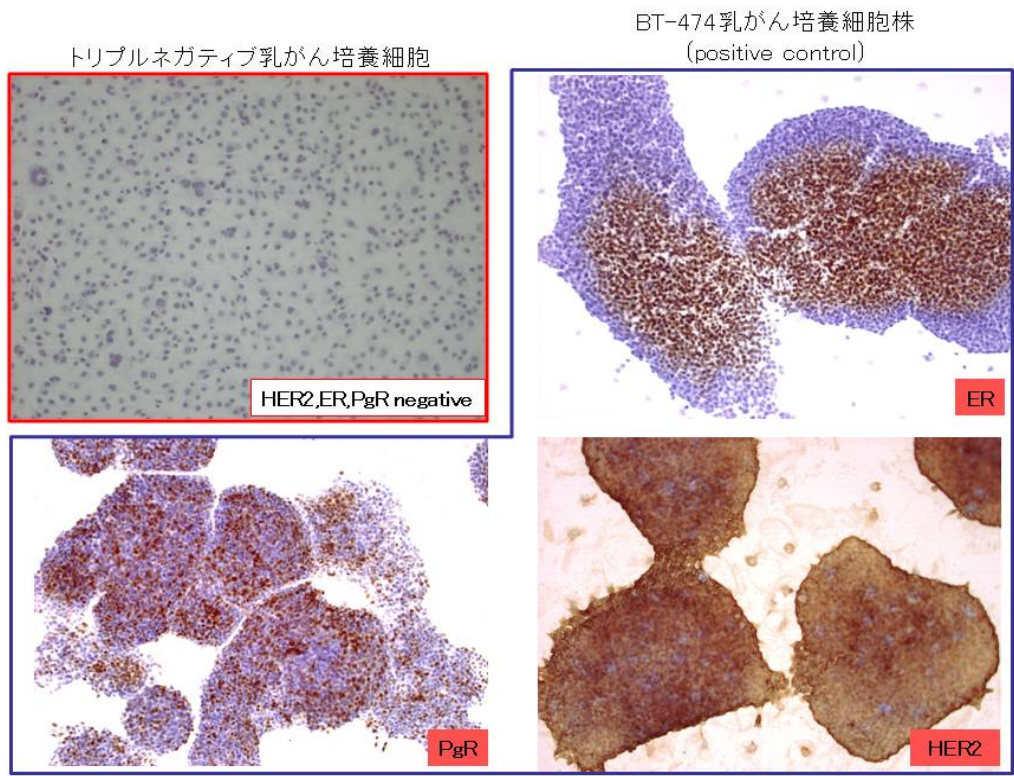


図 4(2)-35 トリプルネガティブ乳がん培養細胞株 (免疫染色)

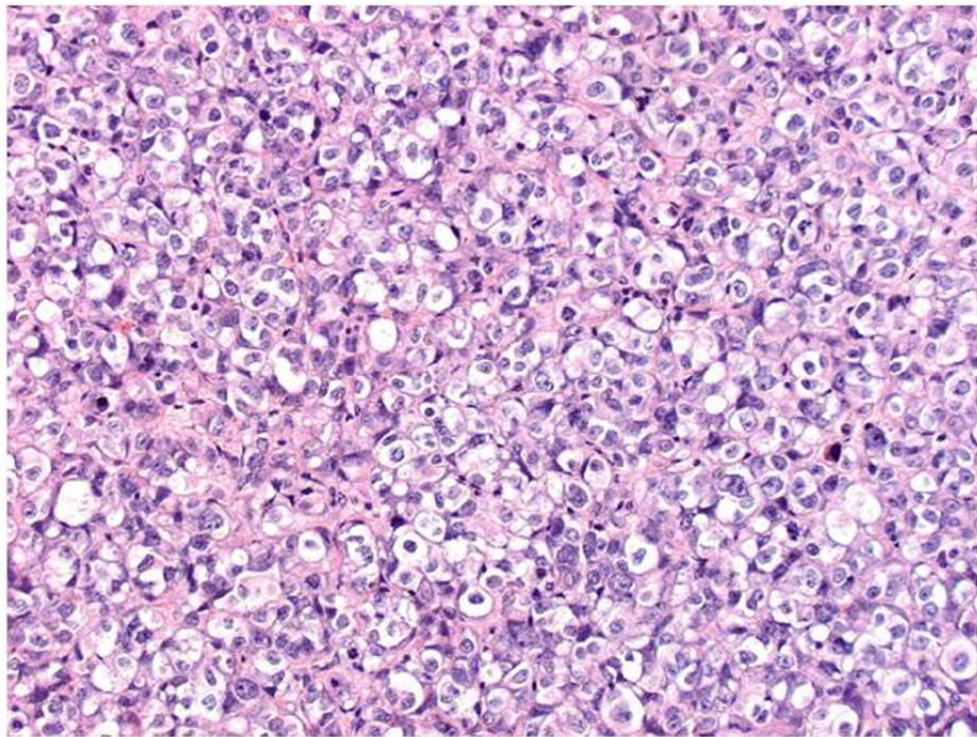
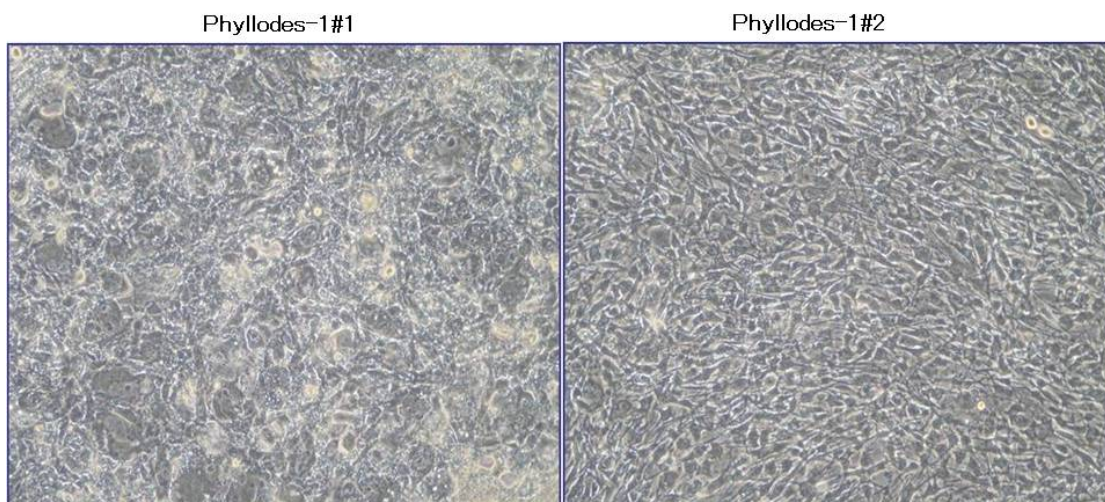


図 4(2)-36 トリプルネガティブ乳がんの SCID マウス移植組織像

Malignant phyllodes tumor#1



臨床材料: 右肺転移巣
病理診断: Malignant phyllodes tumor, metastatic to the right lower lobe of lung, p3, mid-zonal type, lobectomy(origin breast)

図 4(2)-37 葉状腫瘍培養細胞株 (1)

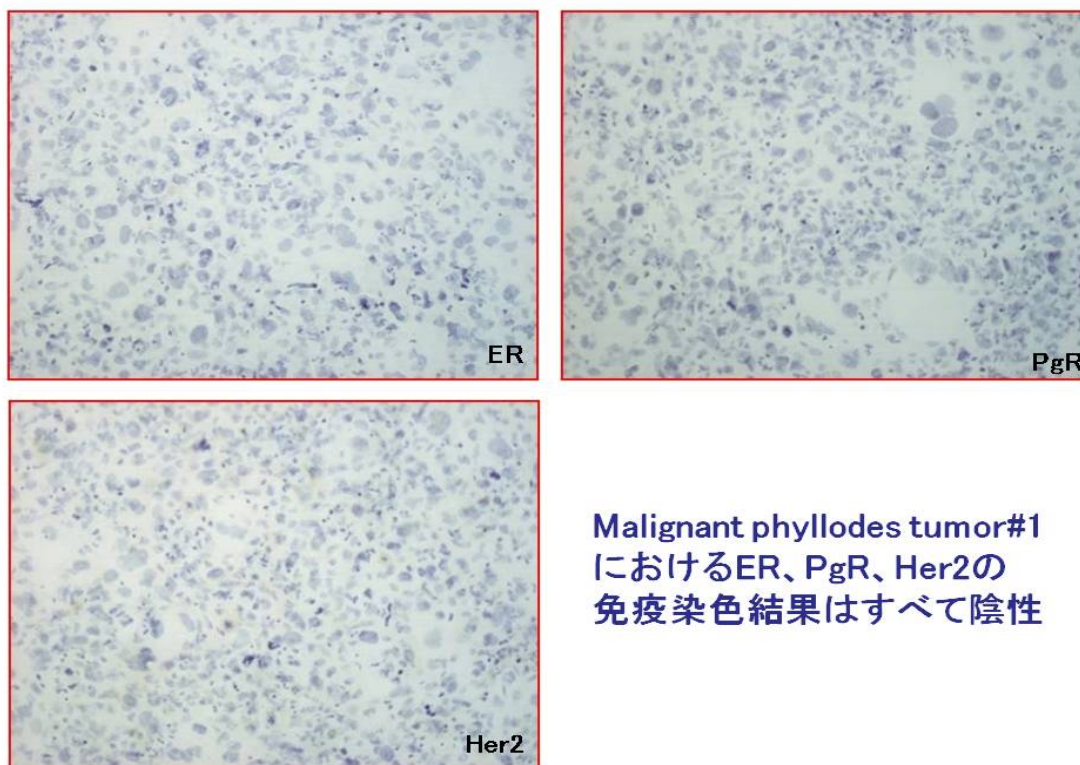


図 4(2)-38 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (1)

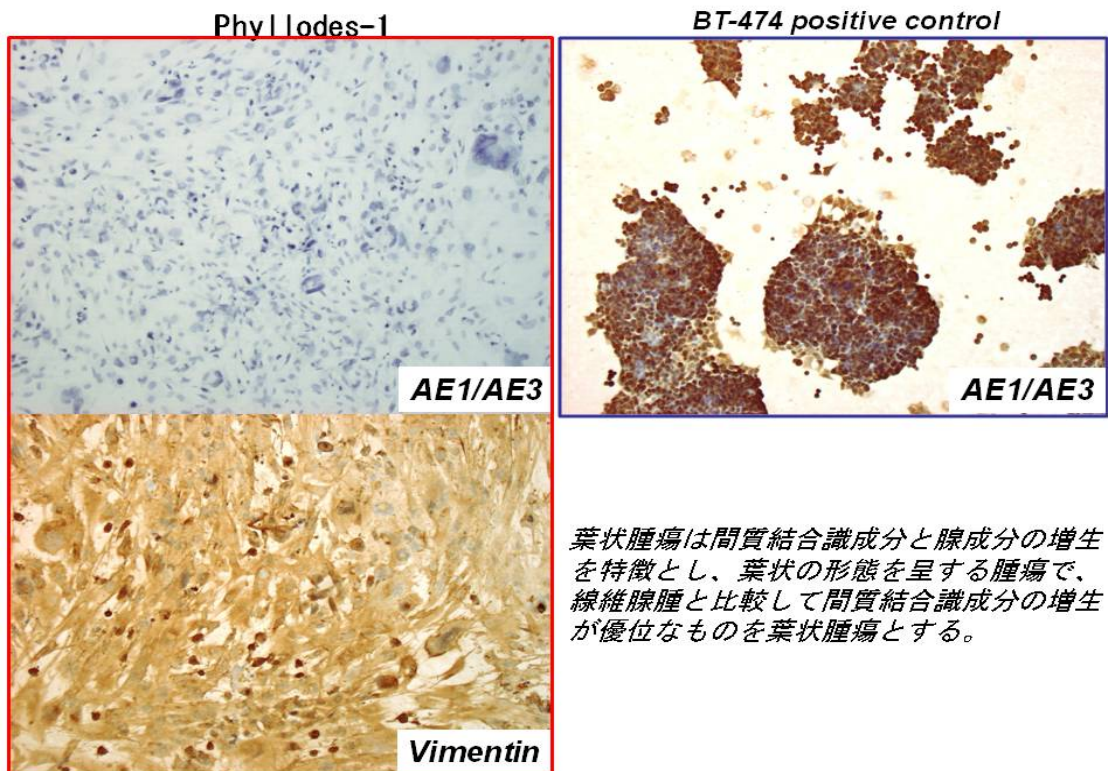
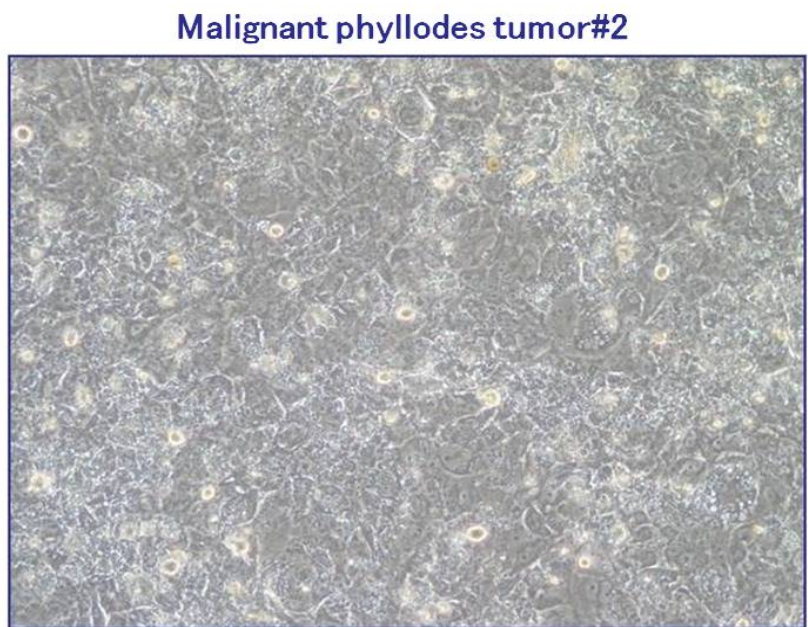


図 4(2)-39 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色（1）



右肺転移巣
病理診断

Malignant phyllodes tumor, metastatic to the right lower lobe of lung,
p0, mid-zonal type (origin breast)

図 4(2)-40 葉状腫瘍培養細胞株（2）

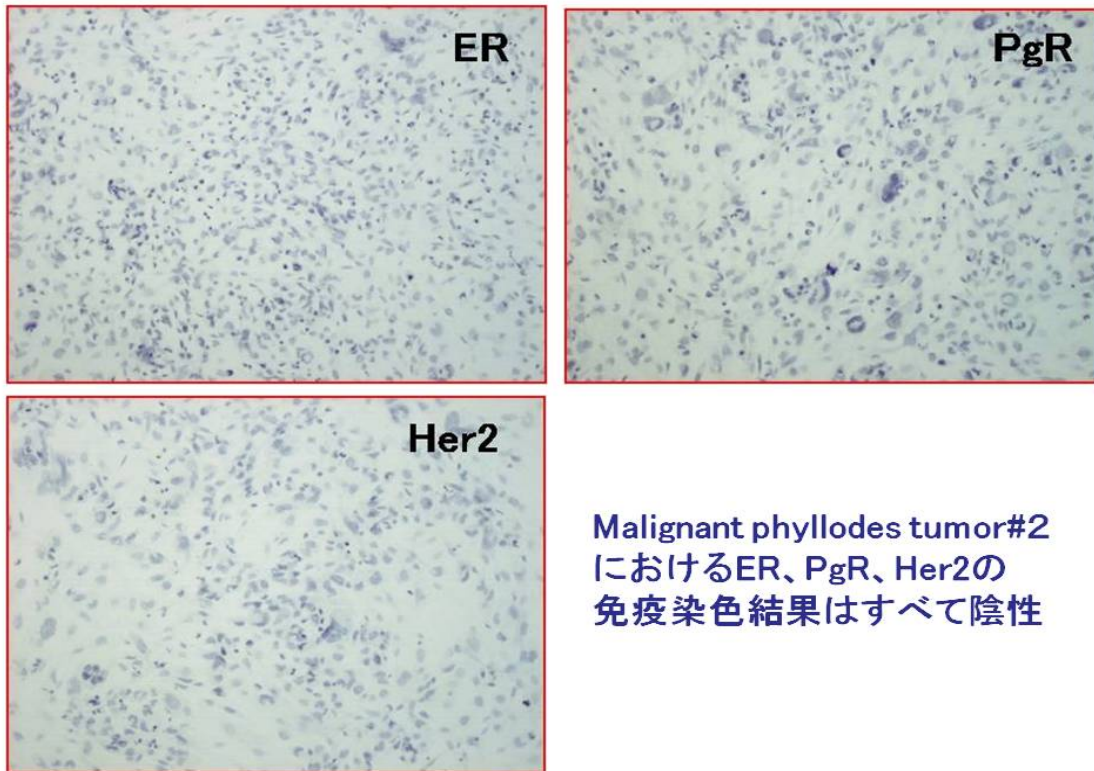


図 4(2)-41 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (2)

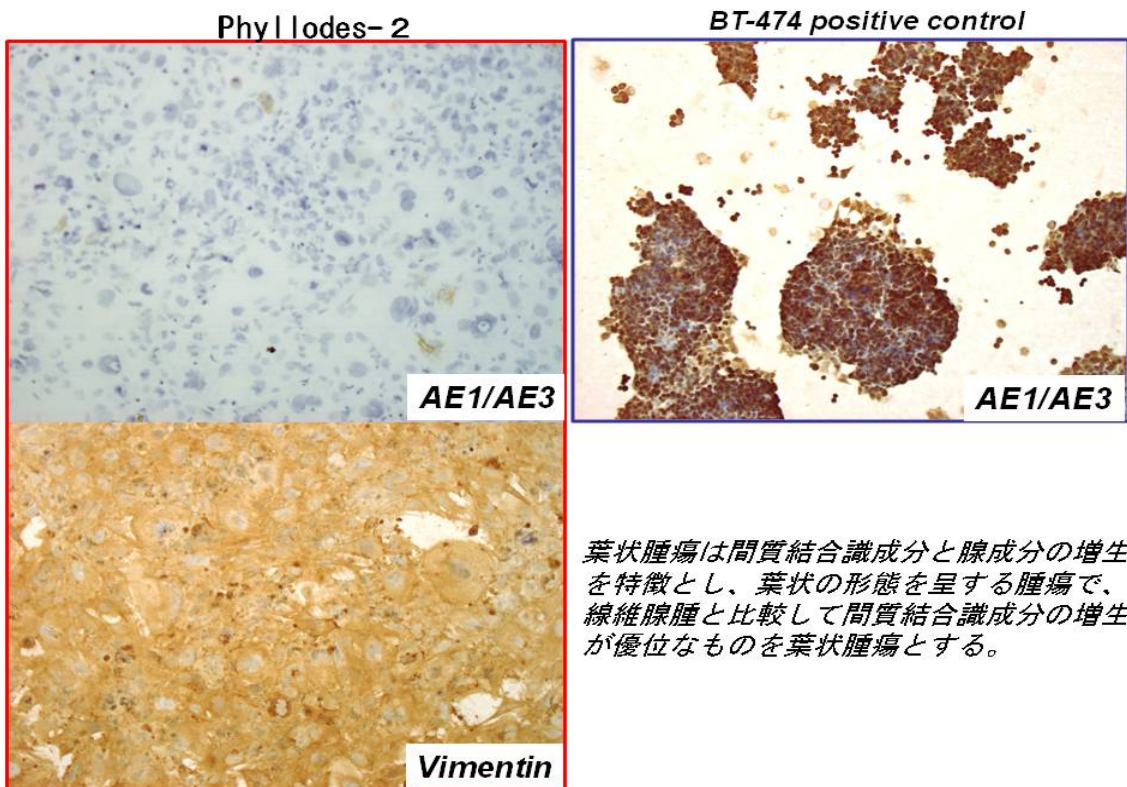


図 4(2)-42 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色 (2)

BrHBC4	髄様腺管がん
BrHBC5	乳頭腺管がん
BrHBC7	硬がん(髄様部分含む)
BrHBC8	炎症性乳がん患者由来の胸水から樹立した上皮由来細胞
BrHBC9	扁平上皮がん由来細胞株
BrHBC10	乳がん患者胸水由来の浮遊細胞株でG-CSF産生を特徴とする
BrHBC11	トリプルネガティブ乳がん(ER、PgR、HER2陰性)充実性腺管がん
Phyllodes-1	原発は葉状腫瘍で肺転移巣から樹立した細胞株
Phyllodes-2	原発は葉状腫瘍で肺転移巣から樹立した細胞株

図 4(2)-43 ヒト乳がん由来細胞株

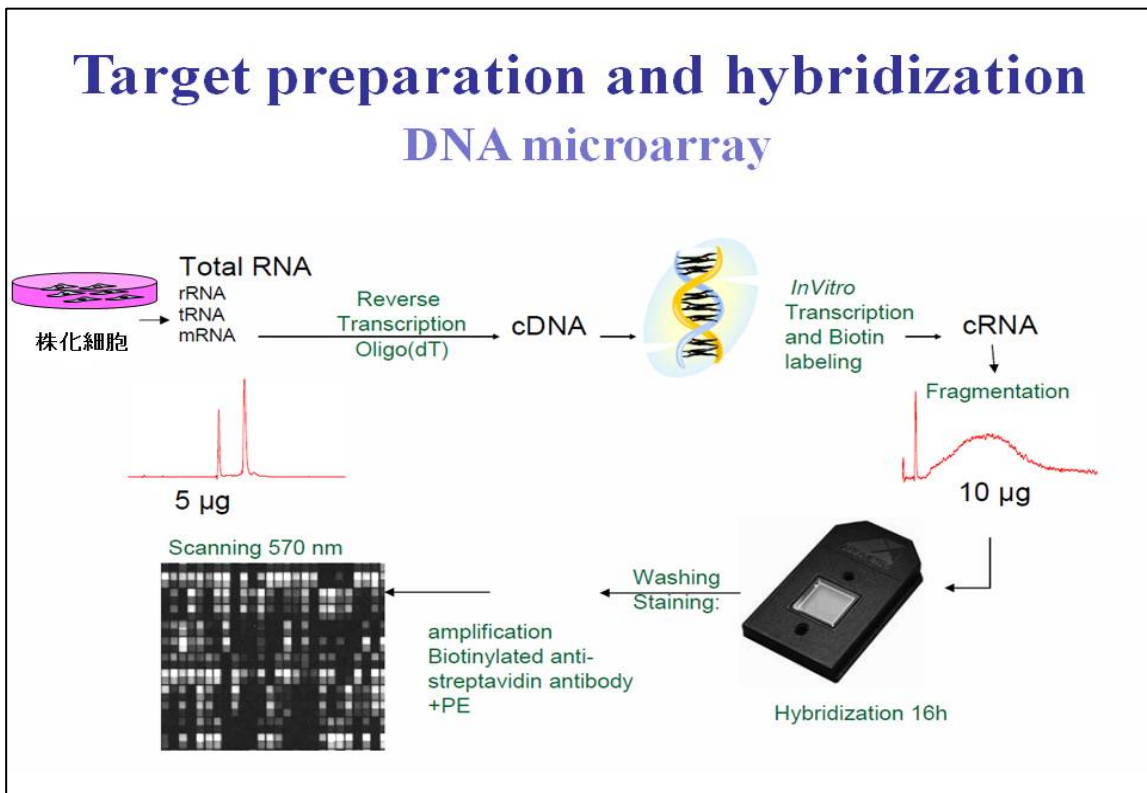


図 4(2)-44 樹立した培養細胞の遺伝子発現解析

—乳がん培養細胞株HBC11(トリプルネガティブ乳がん)—

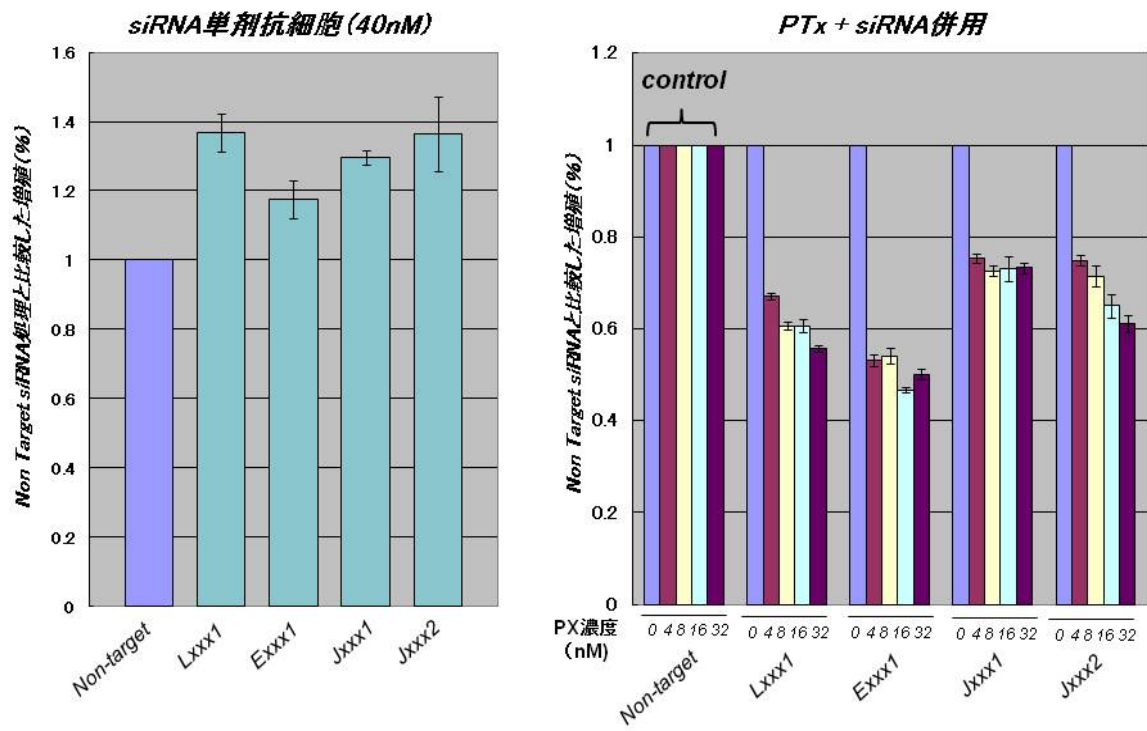


図 4(2)-45 樹立した培養細胞におけるパクリタキセル感受性規定遺伝子の検証

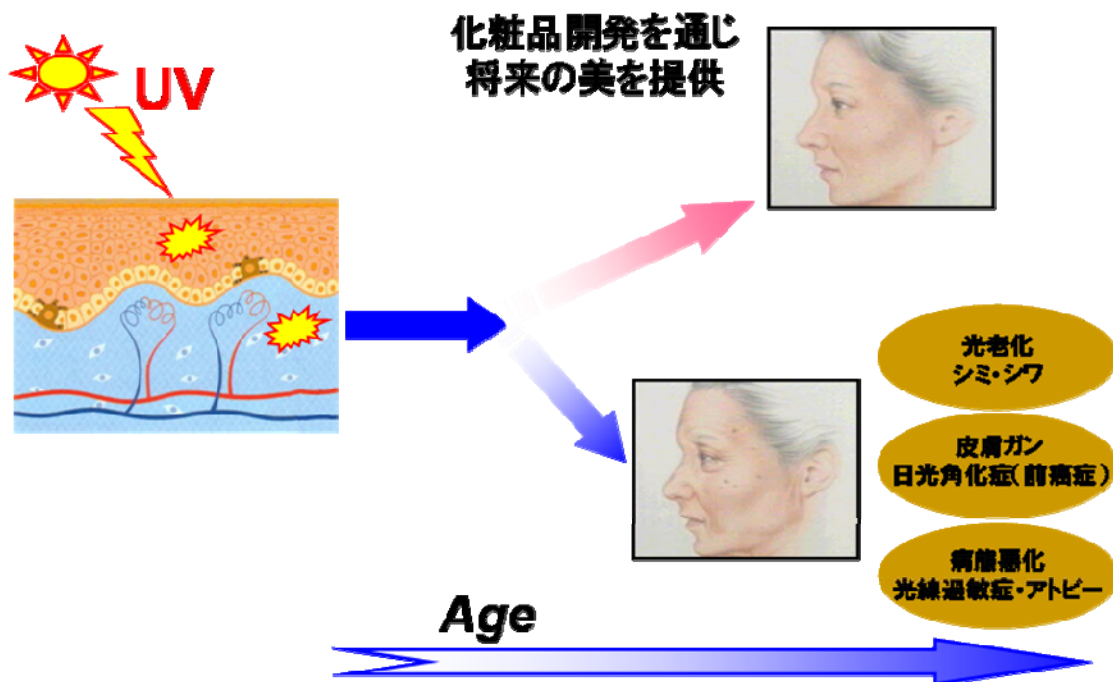


図 4(3)-1 紫外線は皮膚老化を加速させる最大の環境要因

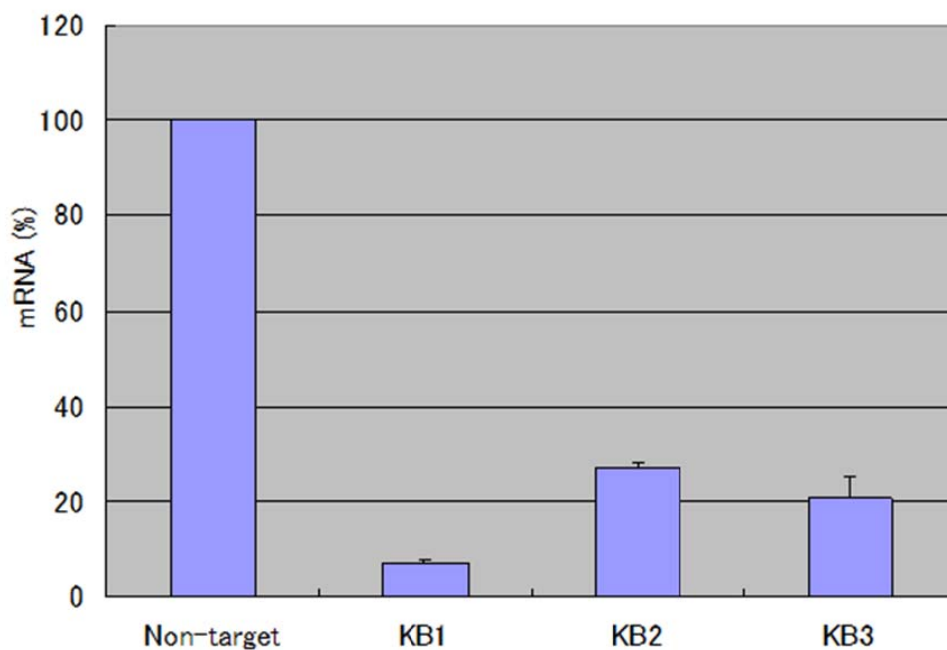


図 4(3)-2 KB 遺伝子の RNA 干渉による発現抑制

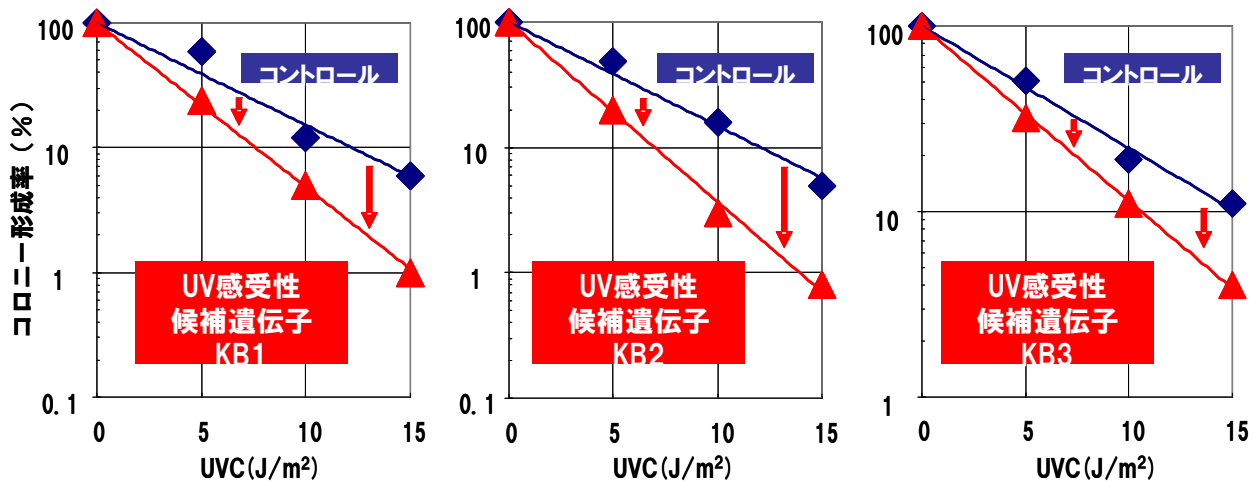


図 4(3)-3 KB 遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

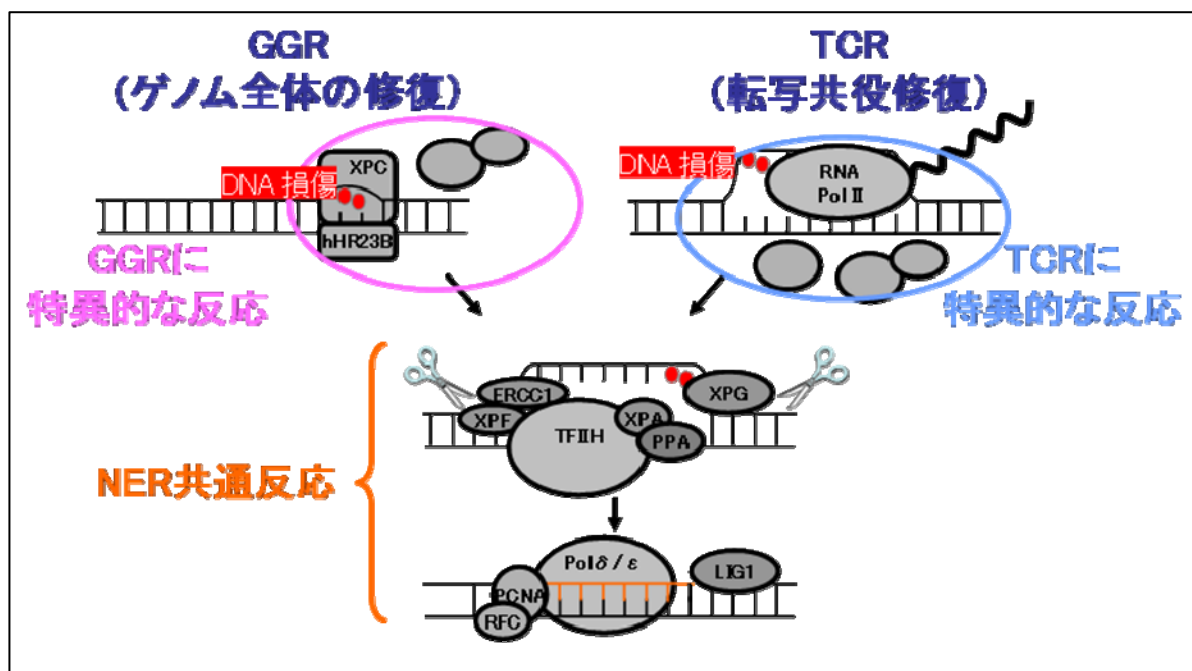


図 4(3)-4 ヌクレオチド除去修復 (NER) の 2 つの反応経路

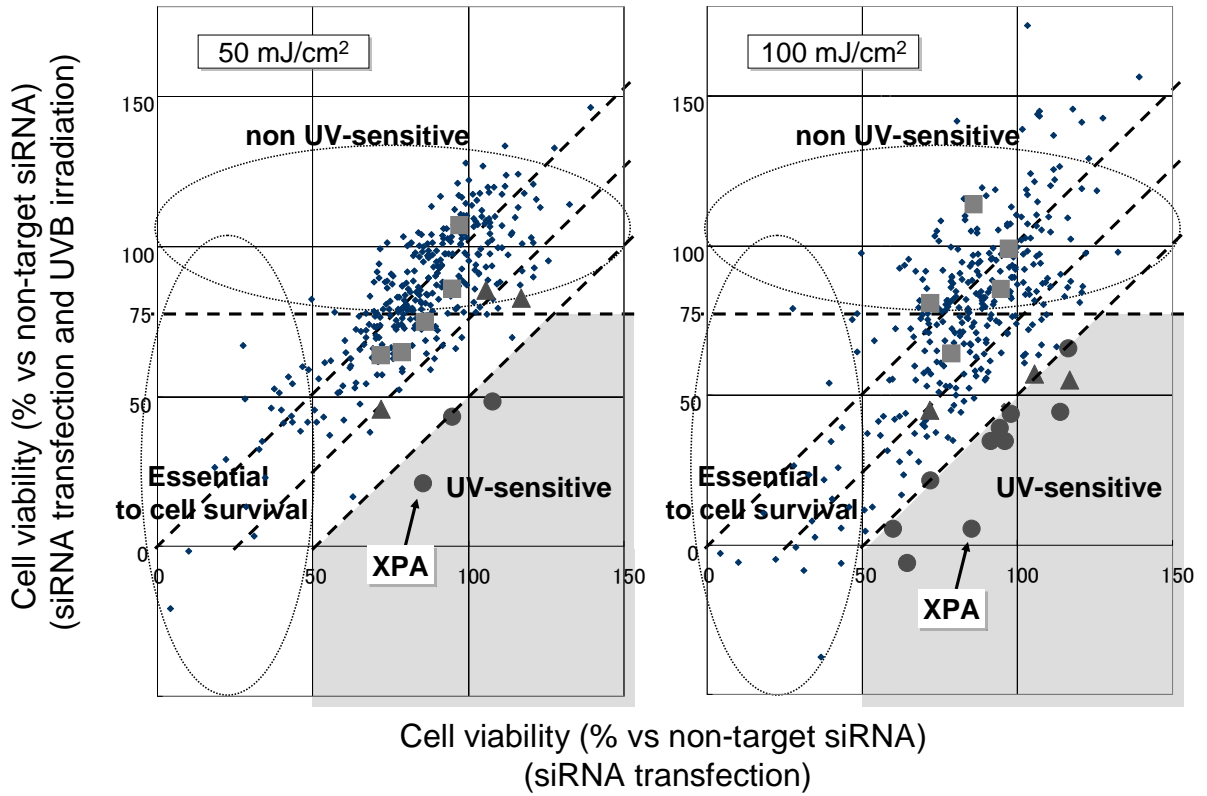


図 4(3)-5 RNA 干渉および紫外線照射後の細胞生存率

- : 紫外線感受性候補遺伝子、■ : GGR 特異的の反応に関わる遺伝子
- ▲ : TCR 特異的の反応に関わる遺伝子

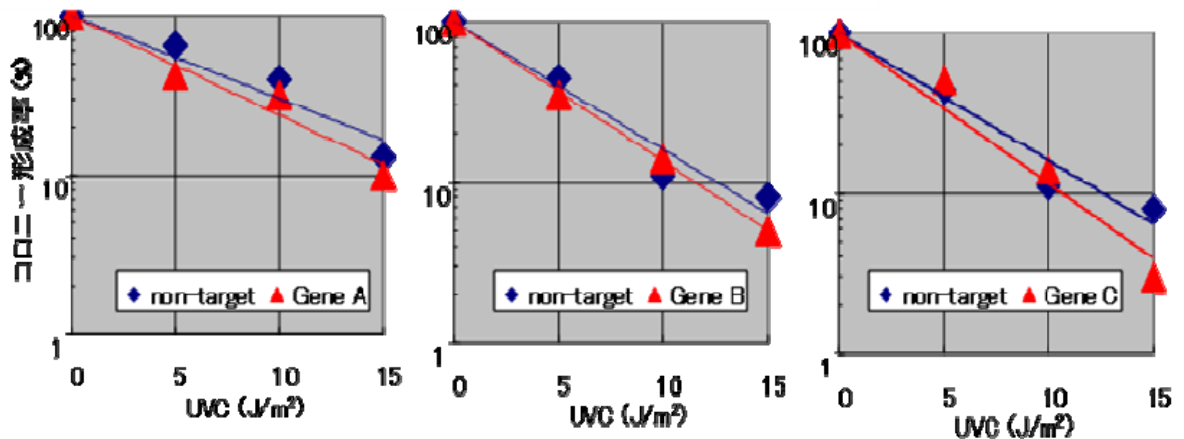


図 4(3)-6 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

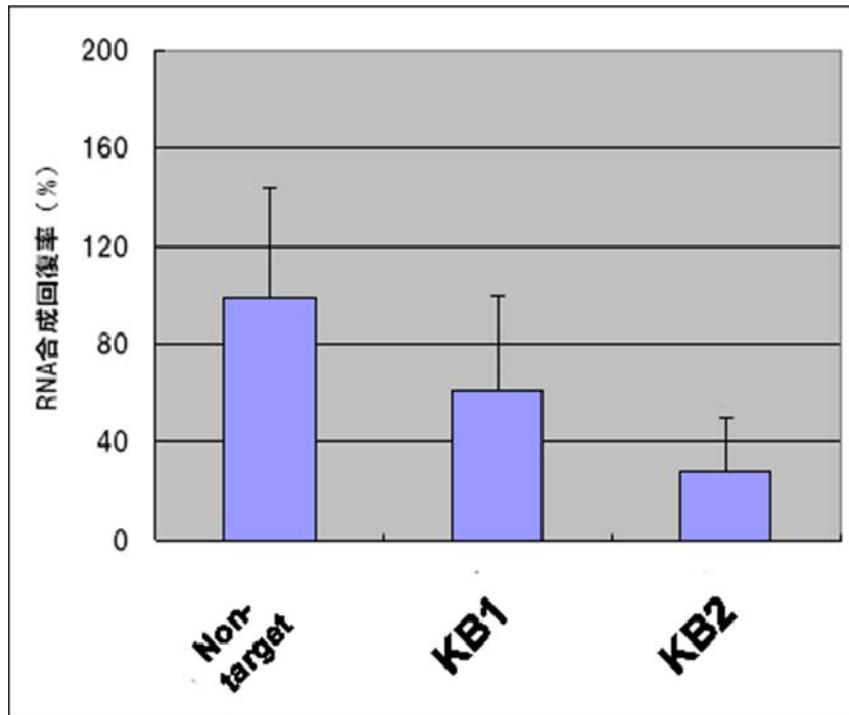


図 4(3)-7 KB 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響

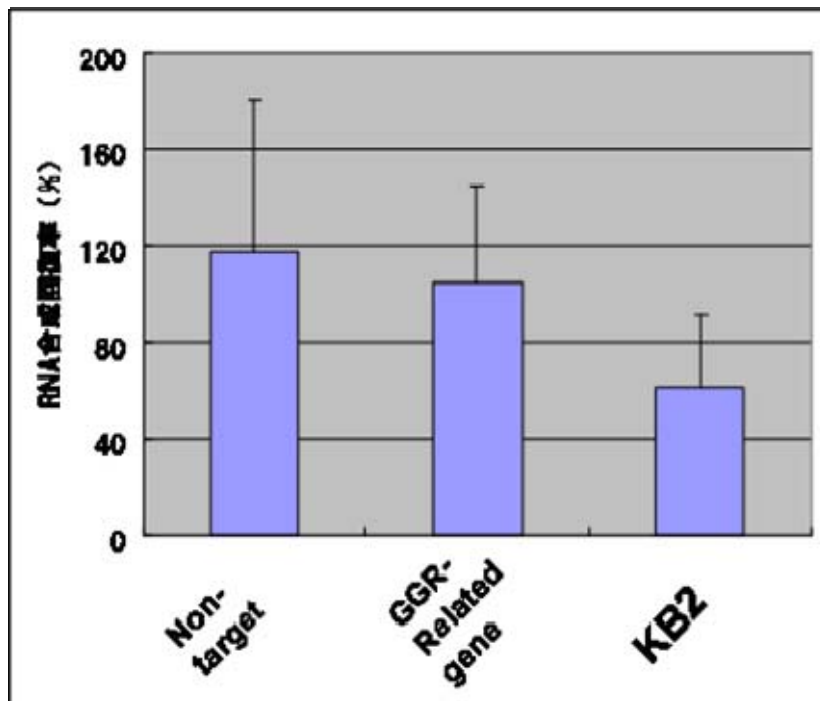


図 4(3)-8 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子および KB2 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響

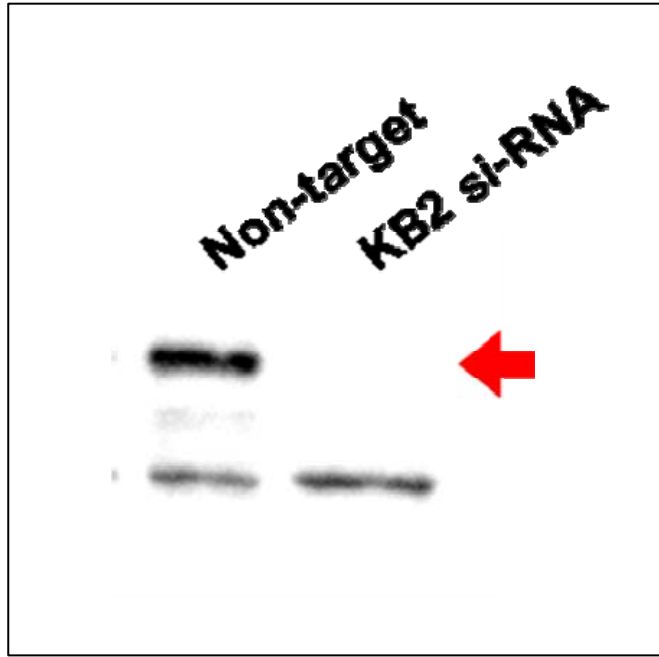


図 4(3)-9 KB2 のウェスタン解析

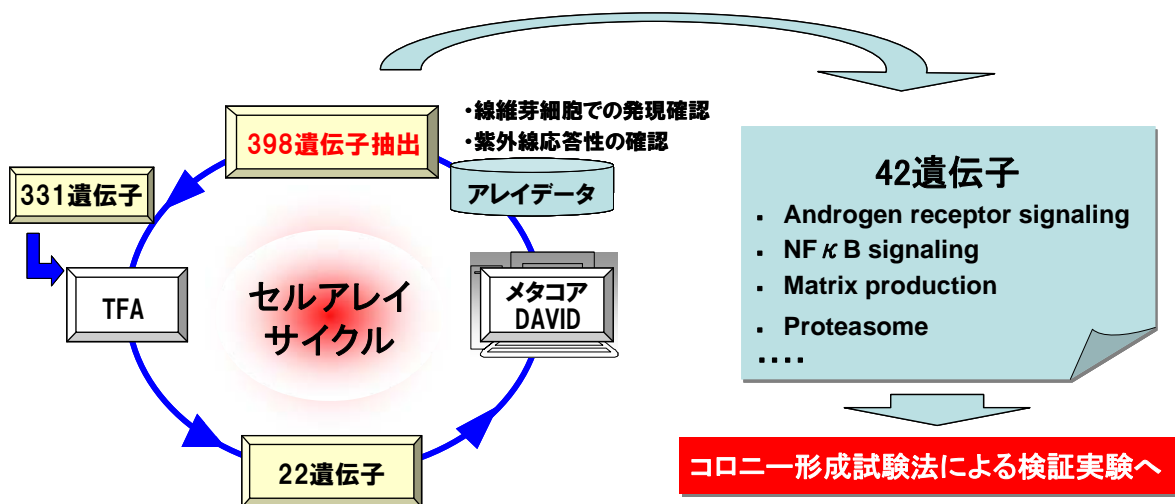


図 4(3)-10 紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張スキーム

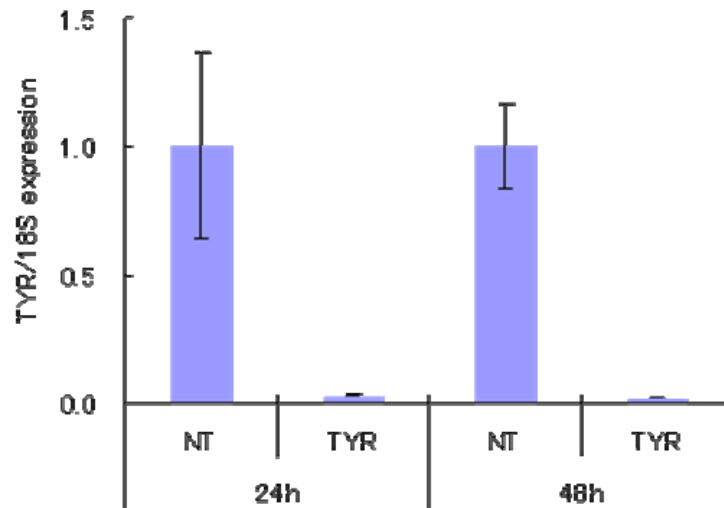


図 4(3)-11 固相リバーストランスフェクション法によるヒト正常メラノサイトの Tyrosinase 遺伝子発現抑制
NT, Non-target siRNA; TYR, Tyrosinase siRNA

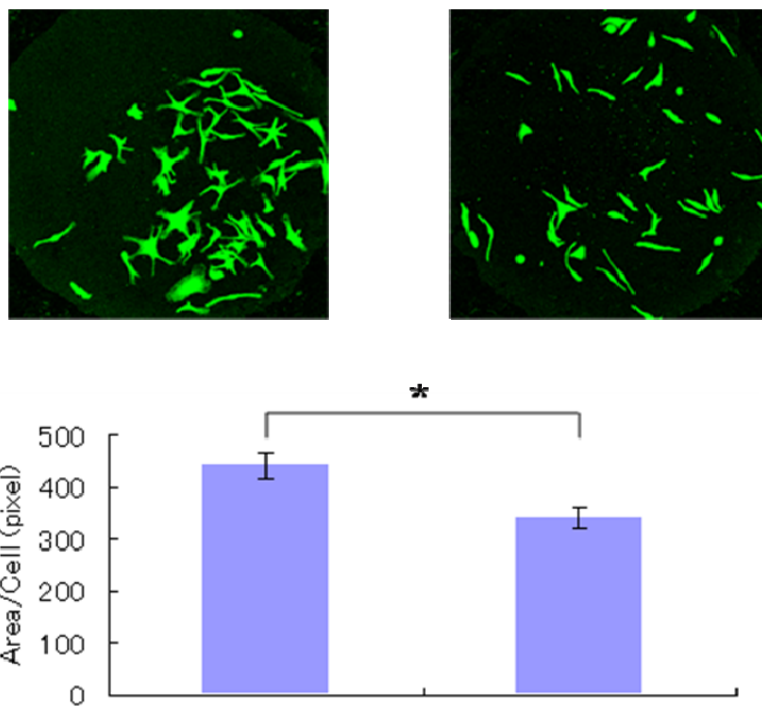
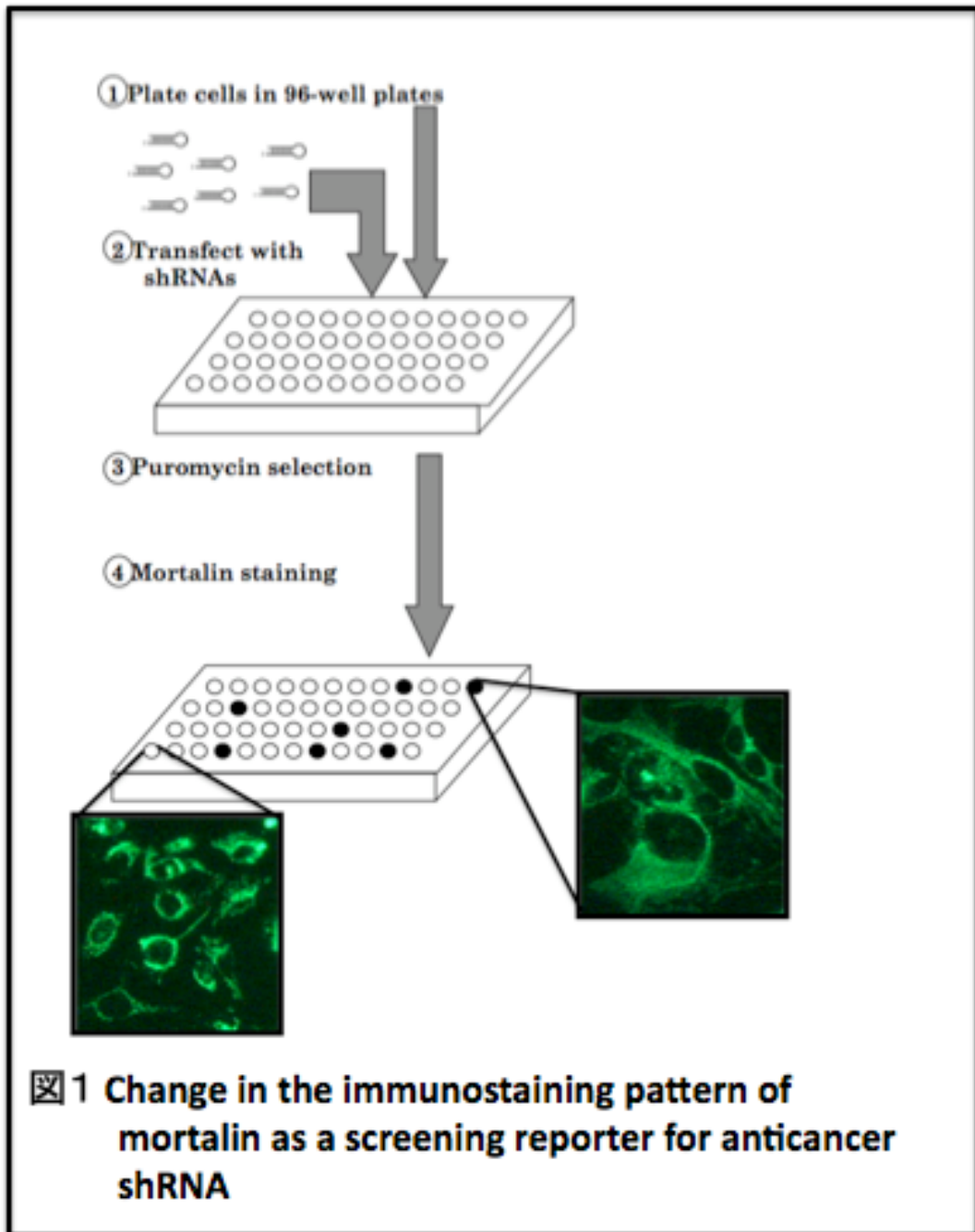
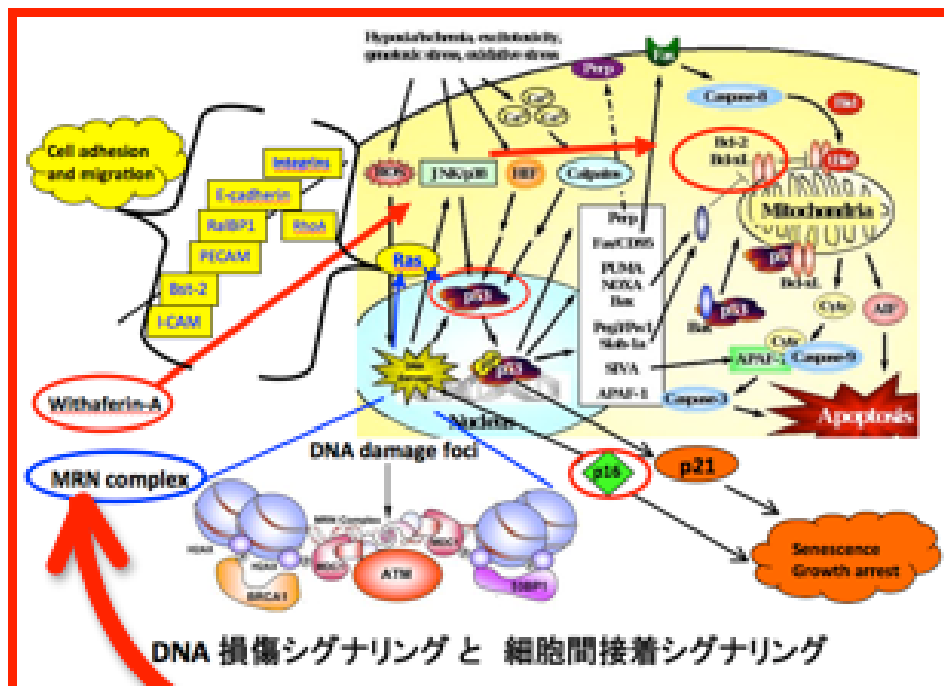


図 4(3)-12 メラノサイトの蛍光標識 (上部画像) と形態変化 (細胞面積) の数値化 (下部グラフ)
左: 増殖用培地で培養したメラノサイト (活性化状態)
右: 最小培地で培養したメラノサイト (不活性化状態)
* t-test ($p < 0.05$)



☒ 4(4)-1



2

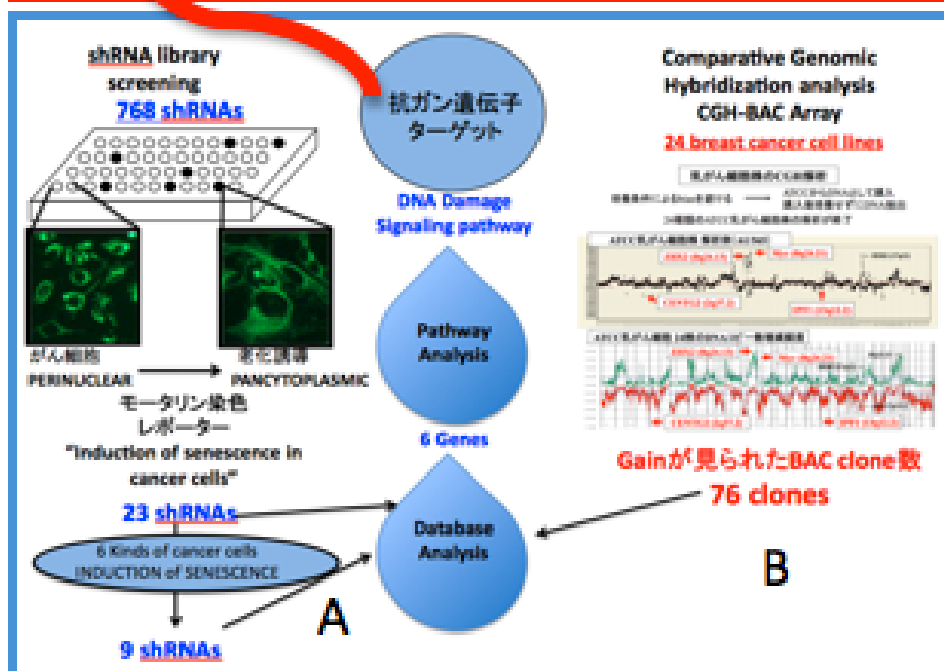


図2 Gene targets identified from the gene silencing and CGH screening of cancer cells hit DNA damage signaling pathway as a candidate target pathway

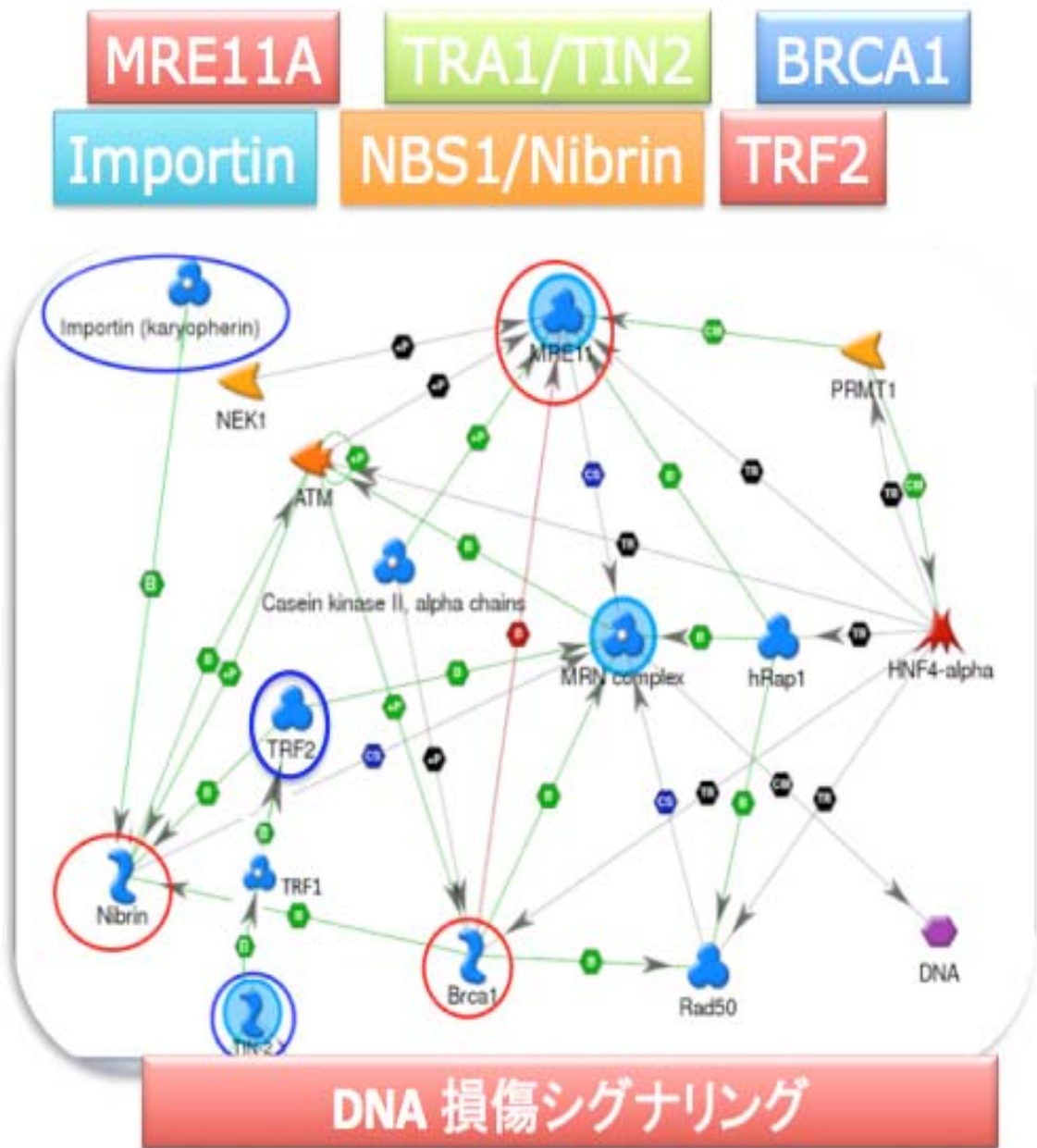
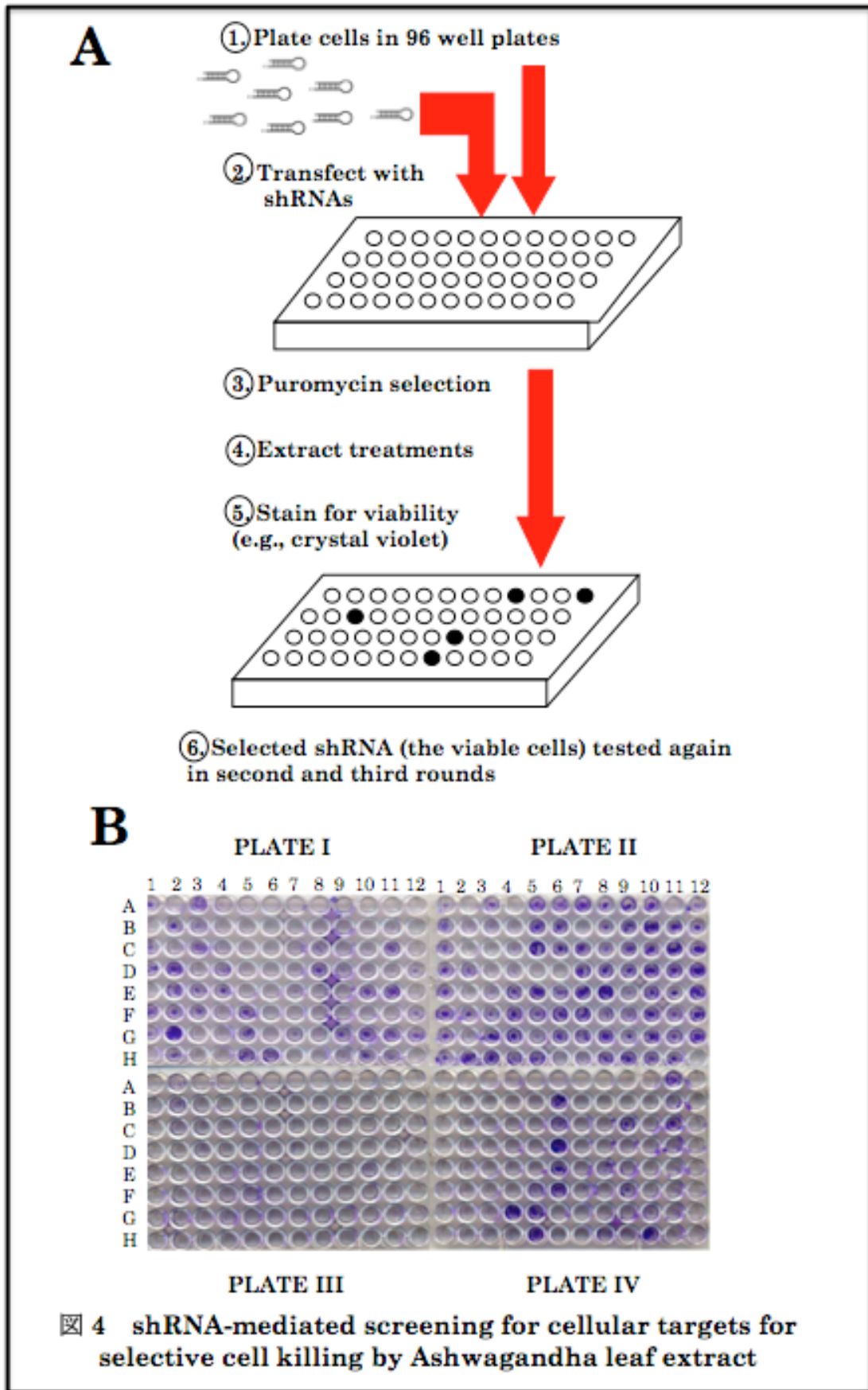
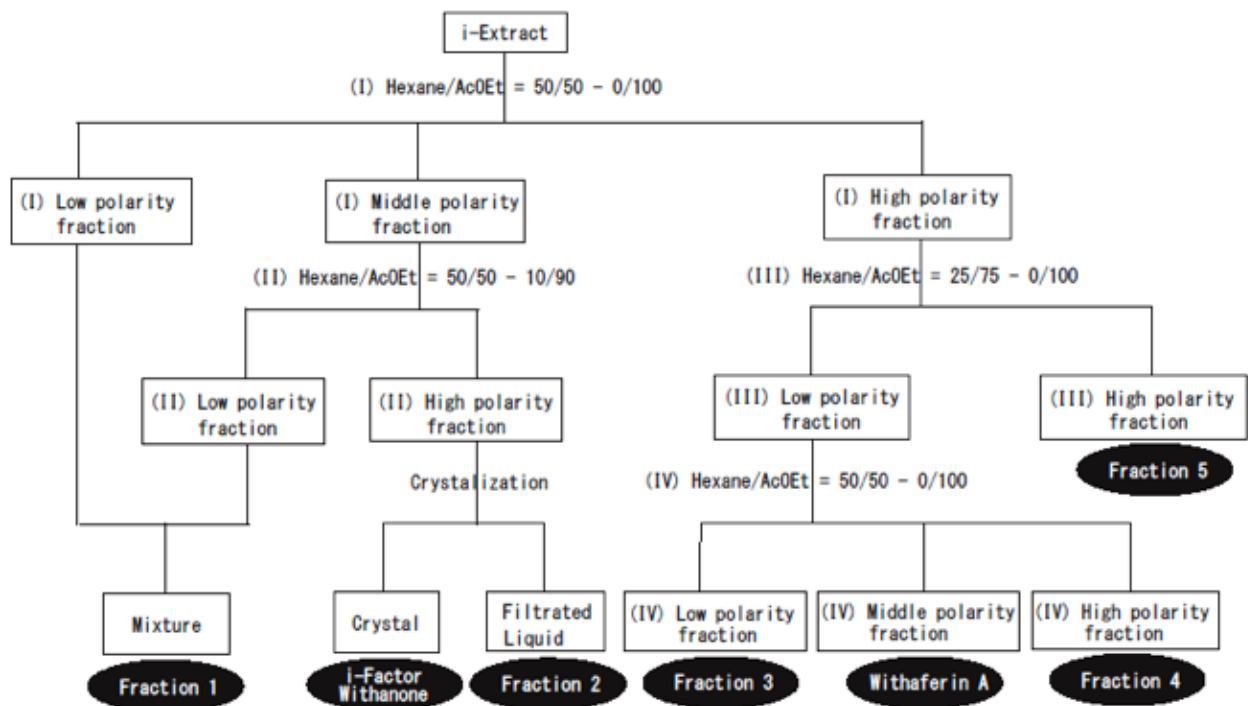


図3 Gene targets selected on the basis of shRNA library screening for induction of senescence in cancer cells

図 4(4)-3

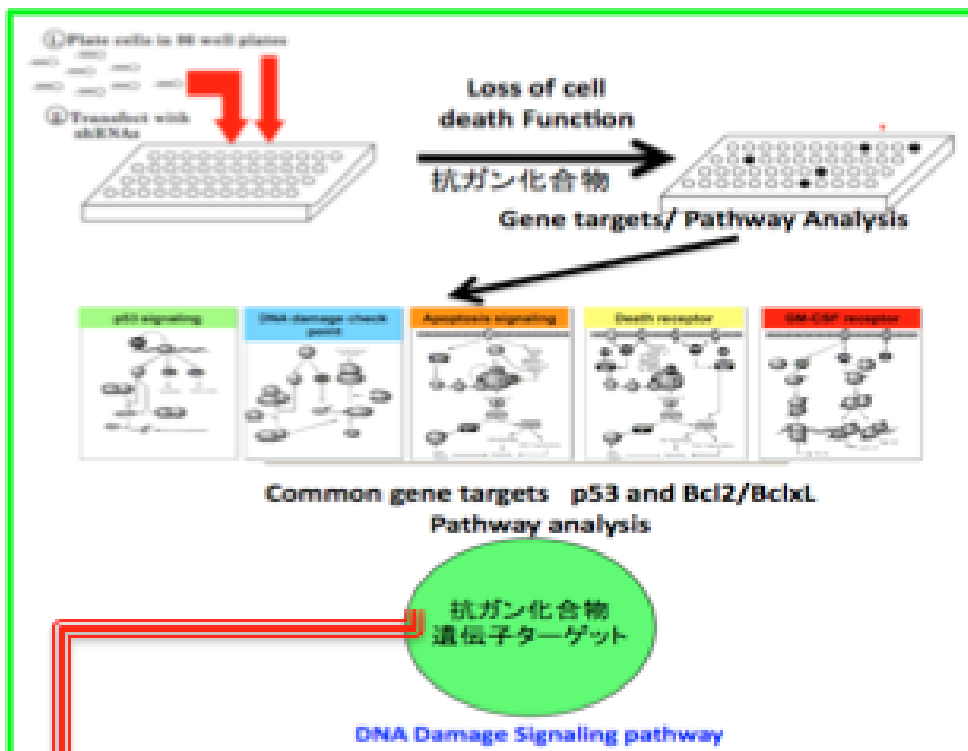


☒ 4(4)-4

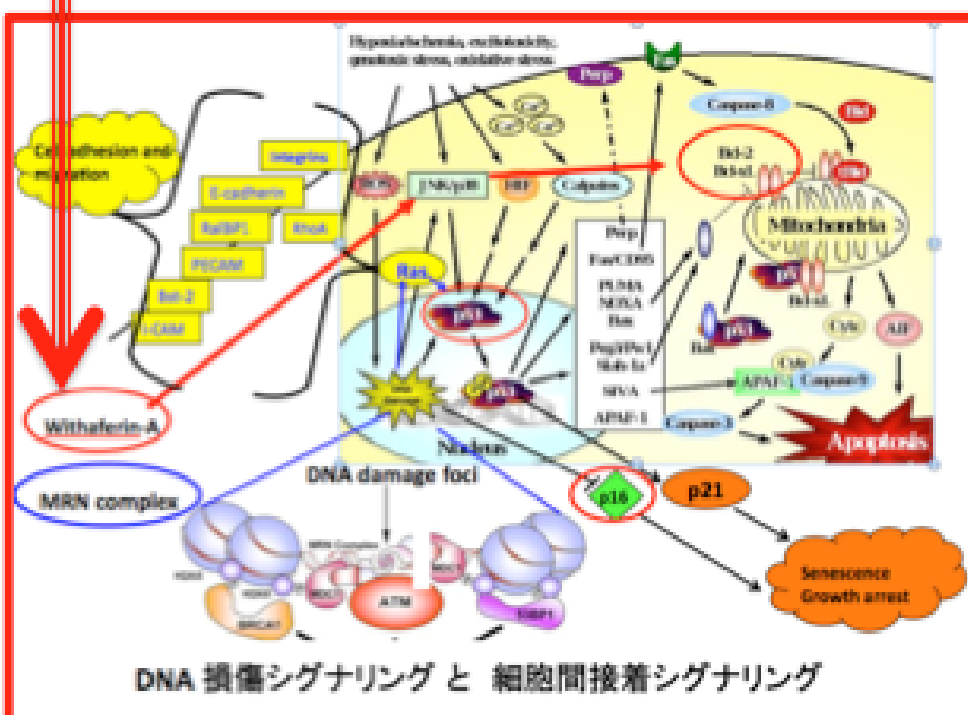


☒5 Fractionation of i-Extract by silica gel chromatography using silica gel column

☒ 4(4)-5



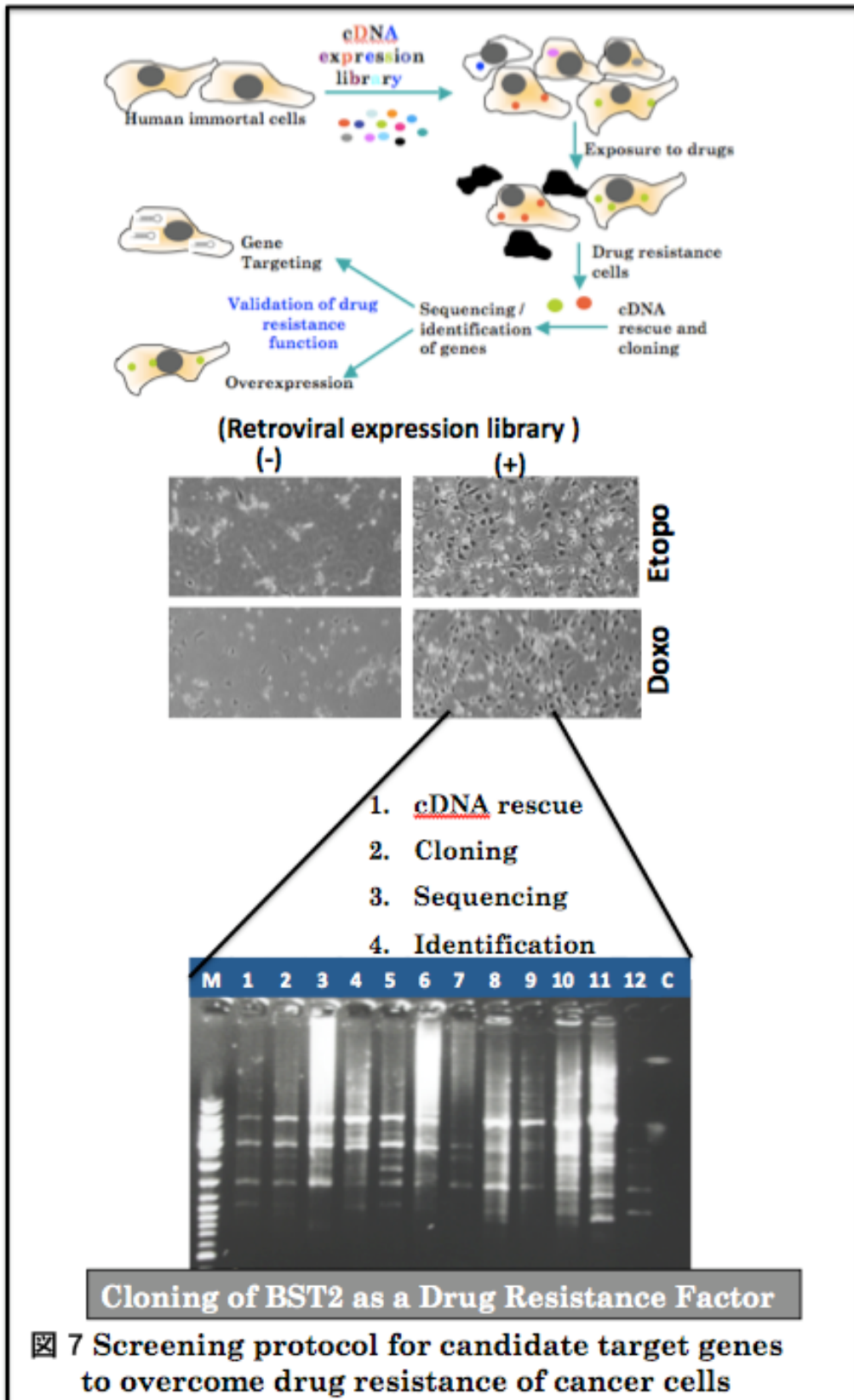
3



2

図6 Gene targets identified from selective killing of cancer cells hit p53 and Bcl2 components of DNA damage signaling pathway

図 4(4)-6



☒ 4(4)-7

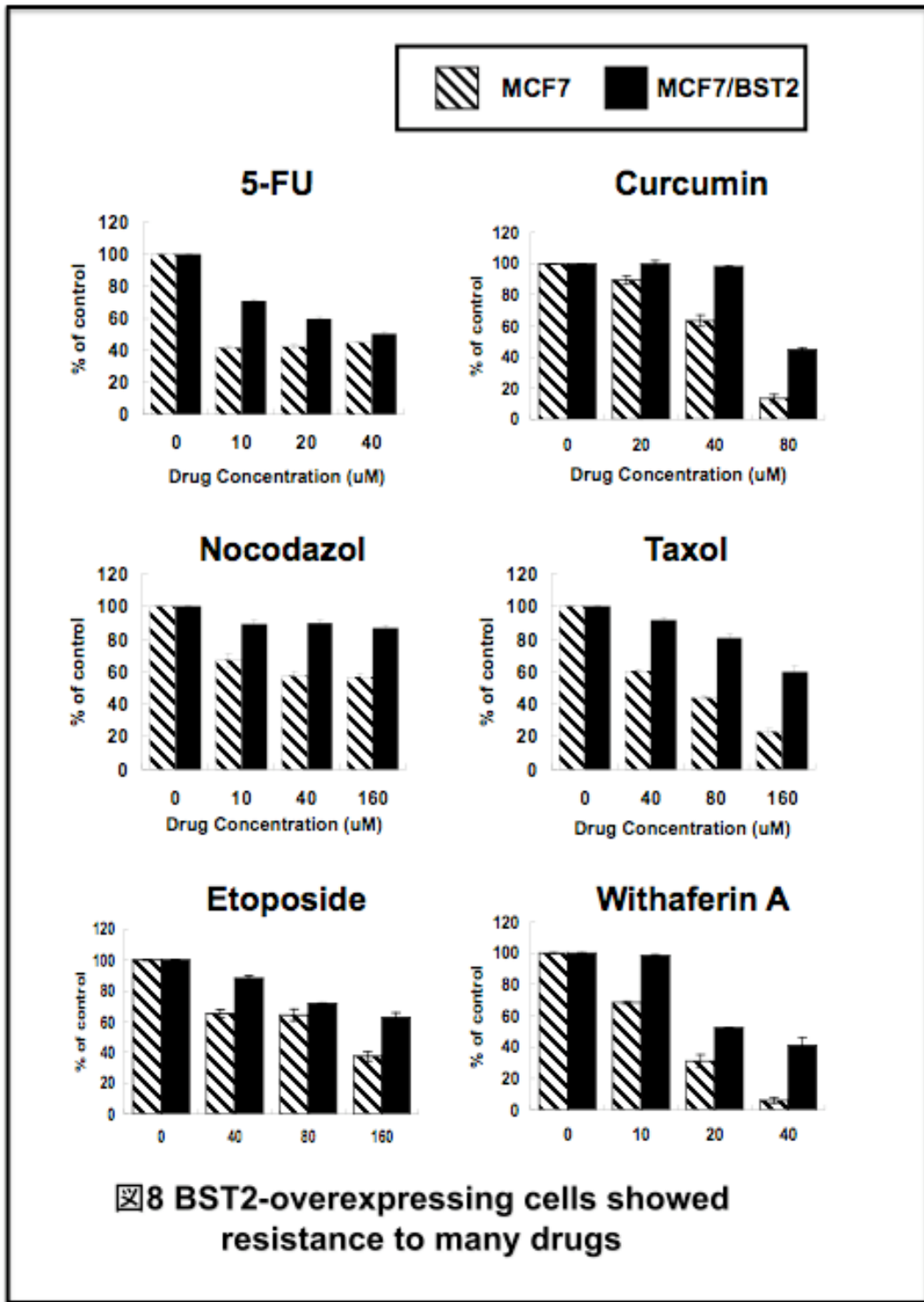


Figure 4(4)-8

圖 4(4)-9

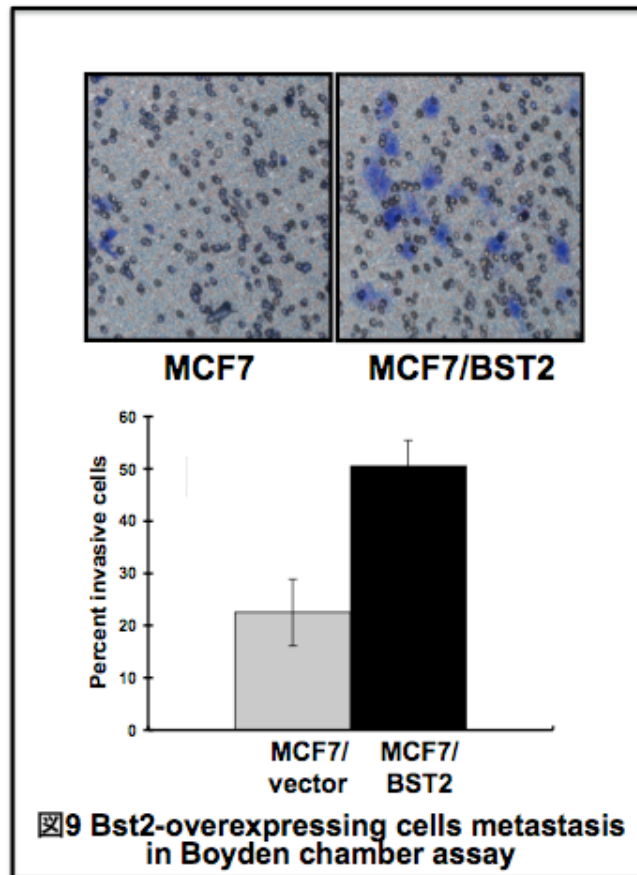
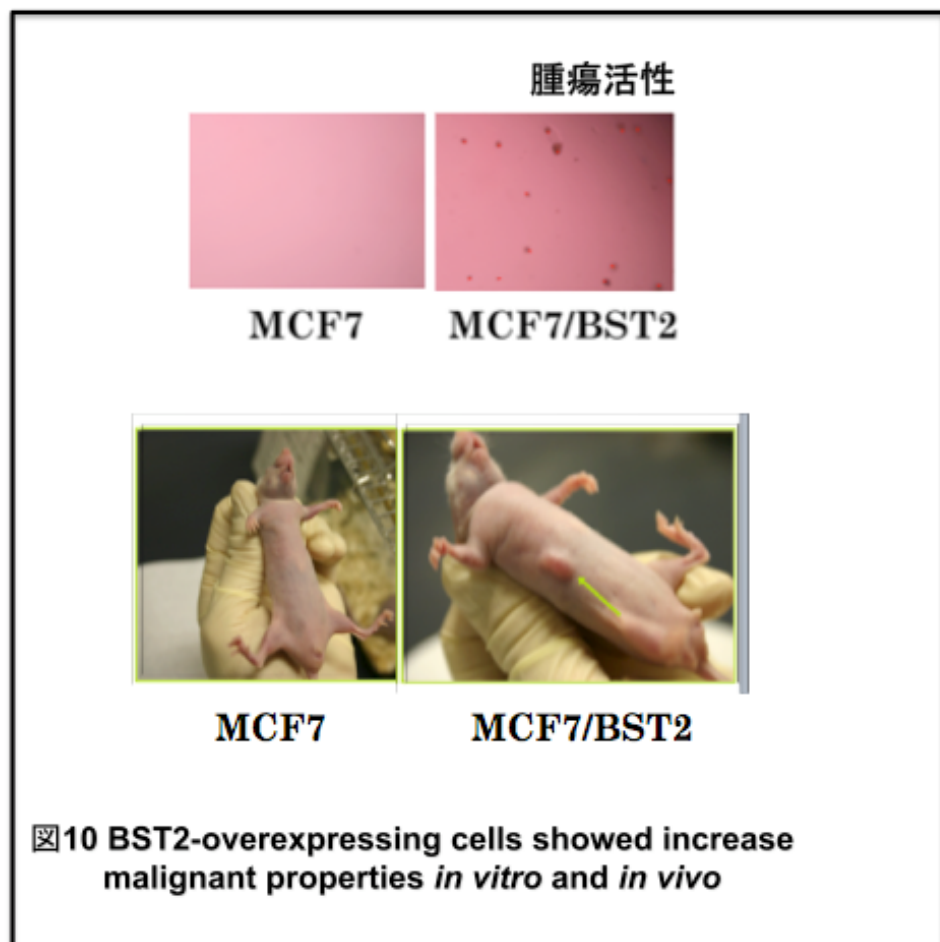
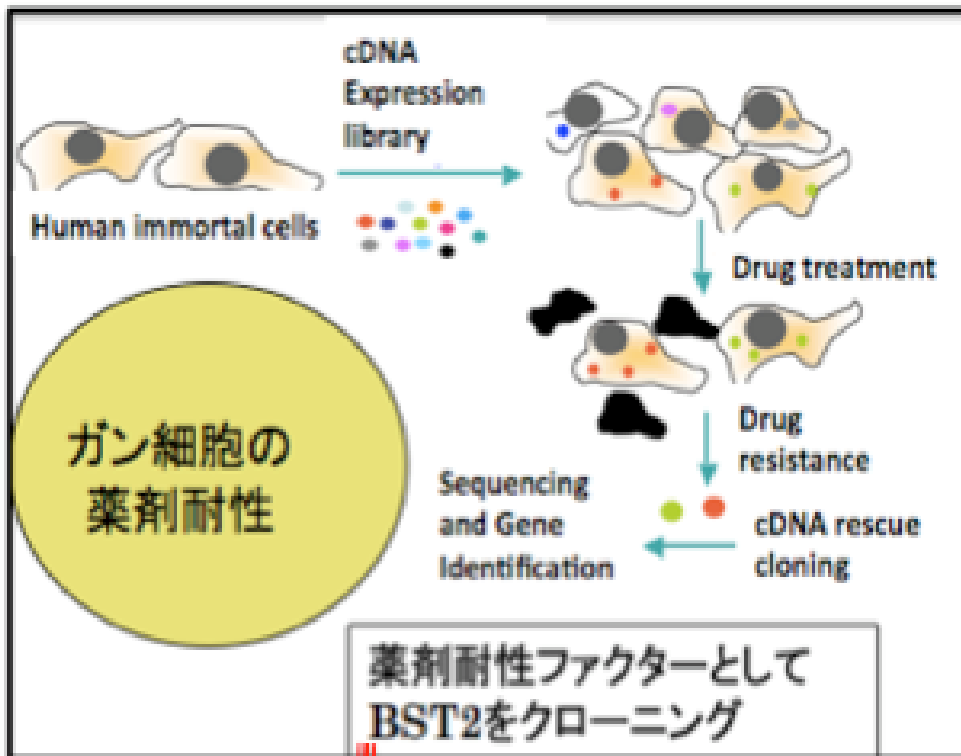
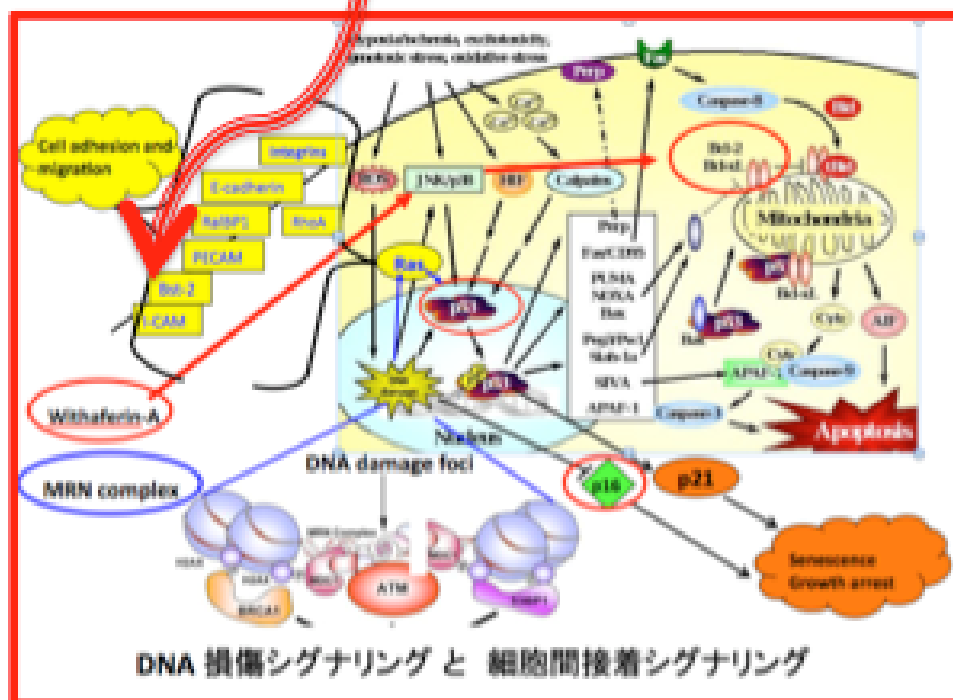


圖 4(4)-10





4



2

図11 Gene target identified for drug resistance of cancer cells hit cell adhesion regulatory component (BST-2) of the DNA damage response machinery.

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（アステラス製薬）

（1）まえがき

細胞機能は生体における種々の内因性因子（神経伝達物質やホルモン等）や薬剤などの外的因子、さらには、疾患等による器質的变化によって変動する。健常では、このような変動はある一定の振幅で制御されている。一方で、疾患は、正常な組織や細胞の機能が外的及び内的要因によって機能制御不能に陥った状態と捉えることができる。近年、正常組織と病変組織の機能や状態の差異を包括的遺伝子発現解析やプロテオーム解析から探り、それらの解析結果から新たな創薬ターゲットを探索する試みが数多くなされている。しかし、一般に疾患に伴い発現変動する遺伝子の数が数百・数千と膨大に及ぶことから、これら変動遺伝子の中から有望な創薬ターゲット遺伝子を絞り込むことは容易ではなく、そのための有効で効率的な探索・検証技術の開発が求められている。

内因性ホルモンであるインスリンは、食事等による血糖値の上昇に起因して膵臓のβ細胞から分泌され、標的細胞である骨格筋、肝臓、脂肪等に作用して糖の利用を亢進し、上昇した血糖値を低下させ一定値に保つように働く。糖尿病には、主にインスリン分泌不全に起因するⅠ型糖尿病とインスリン抵抗性を特徴とするⅡ型糖尿病に大別されるが、臨床における患者の殆どはⅡ型糖尿病である。糖尿病治療薬には、インスリン、インスリン分泌促進薬、インスリン様作動薬、インスリン抵抗性改善薬などが知られている。近年可能になった包括的遺伝子発現解析技術によって、これら内因性因子や治療薬が細胞に働き薬効を発現する過程を、また、正常な細胞が糖尿病発症へと変化する過程を、遺伝子レベルでの変化として捉える研究が広く行われるようになってきているが、遺伝子レベルでの変化をもたらす細胞内シグナル生成能の動的変動を捉える包括的な技術は未発達な状況にある。

創薬研究において薬効等を評価する目的で機能保持細胞の使用は必須である。これらの機能保持細胞を用いて、主に「loss-of-function」解析により遺伝子機能の評価、創薬標的探索、薬効のメカニズム解析がなされるが、その際にこれらの細胞への高い効率での siRNA の導入が不可欠となる。しかし、実際に創薬研究に利用可能な機能保持細胞に対して高い効率で遺伝子や siRNA を導入することは必ずしも容易ではない。むしろ有用な機能を持つ細胞では導入効率が極めて低い場合が多く、通常はウイルスベクターを用いることで遺伝子を導入せざるを得ない。こういった方法では、実験管理や実験担当者の安全衛生上の制約等から多数の遺伝子を細胞に導入し遺伝子機能をハイスループットでスクリーニング（評価）することは現実として困難であり、導入試薬を用いた簡便な遺伝子や siRNA の導入技術の開発が切に望まれている。

本研究開発では、疾患或いは内因性の神経伝達物質やホルモン、さらには薬剤刺激により機能変化をもたらす細胞系に対して、cDNA や siRNA を効率よく導入可能な技術を開発し、siRNA による遺伝子ノックダウンによりもたらされる細胞機能の変化を、活性の変化や遺伝子発現の変化として、さらには、タンパク質リン酸化活性を指標とした細胞内シグナル生成能の変化として質的且つ量的に検出することで当該遺伝子機能を解析可能とする技術の開発を行う。

（2）研究開発の目標

本研究開発では、糖尿病治療薬探索に応用可能な遺伝子や siRNA の機能評価技術を「カルチャープレート型細胞アレイ」を用いて開発する。具体的には、機能保持細胞を用いて、主に「loss-of-function」解析による遺伝子機能の評価、創薬標的探索、薬効のメカニズム解析を可能とする技術の開発を行う。また「リン酸化アレイシステム」を使ったリン酸化プロファイリングによりリン酸化マーカーを探索

し、導入 siRNA および薬物の機能評価のための「カルチャープレート型細胞アレイ」に活用する。開発技術は、大きく次の5つの要素技術からなる。即ち、(i)機能保持細胞系の確立、(ii)機能保持細胞への高い効率での siRNA の導入技術の開発、(iii)導入された siRNA の機能検証技術の開発、(iv)開発技術の妥当性検証のための技術の開発、(v)開発技術を一般化するための技術の開発、の5つである。

<開発目標とする5つの要素技術>

- i 機能保持細胞系の確立
- ii 機能保持細胞への高い効率での siRNA の導入技術の開発
- iii 導入された siRNA の機能検証技術の開発
- iv 開発技術の妥当性検証のための技術の開発
- v 開発技術を一般化するための技術の開発

糖尿病領域をモデルケースとして先導的に技術開発を行い、さらに一般化を図ることで普遍的な技術とする。このうち、(i)~(iii)は中間評価までに開発目標を達成し、(iv)と(v)については中間評価をはさんで継続開発することで目標に達成する予定である。各要素技術の達成目標は以下の通りである。(i)では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。(ii)では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。(iii)では導入した siRNA の機能を生物活性変化や mRNA 及び蛋白質発現量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プローブ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 の機能の評価・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。(iv)では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を可能とすることにより検証する。(v)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应用することで達成される。

(3) 研究開発の成果

前述の5つの要素技術の開発は、具体的には、肝細胞における糖産生能の変化、リン酸化シグナルの変化、或いは遺伝子発現の変化を指標として、糖尿病治療薬であるメトフォルミンの薬効発現の分子メカニズム解析やリン酸化マーカー探索、さらには、メトフォルミンと同様に糖新生抑制作用に基づく糖尿病治療薬創製のための新規創薬標的探索の研究開発の過程で実施した。

i. 機能保持細胞系の確立

創薬研究では機能保持細胞を用いた展開が必須である。特に、薬剤の効果(薬効)を細胞機能の変化として定量的に評価が可能な細胞系は重要である。本研究開発では糖尿病治療薬探索分野をモデルケースと設定した。しかし、この分野の研究を遂行する上で必要となる株化された培養細胞系につい

ては適切なものがなく安定性に欠ける初代培養細胞系を使わざるを得ないのが実情であった。しかし、ラット肝臓由来の細胞株のひとつである H4 IIEC3 細胞は、既存の糖尿病治療薬の薬効を糖産生量の変化として定量計測可能な細胞であることを見出し、薬効を糖産生抑制作用として評価可能とした。肝臓は血糖をグリコーゲンとして蓄積する一方で肝臓内のグリコーゲンを必要に応じてグルコースに変換して、或いは、ピルビン酸、乳酸、糖原性アミノ酸からグルコースを新生して血中に放出することで血糖値を一定に保つという双方向的な制御に関わっている。糖尿病状態は正常値を超える高い血糖値が持続された状態であるため、肝臓への糖の取り込みを増やすか糖産生を抑制するような薬剤を見出すことが糖尿病治療薬開発の攻め方の 1 つとなる。本研究開発で確立したラットの肝臓由来の H4 IIEC3 細胞系は、本細胞系を用いることで広く使われている糖尿病治療薬の 1 つであるメトフォルミンの作用を糖産生抑制作用として測定可能としたことで価値が高い(図 1)。この系ではメトフォルミンだけでなくインスリンの作用も確認できることから糖尿病治療薬探索のためのモデル細胞系として極めて有用である。

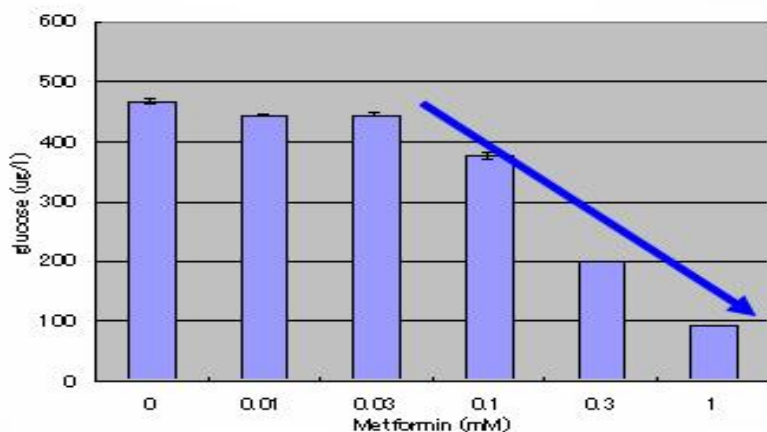


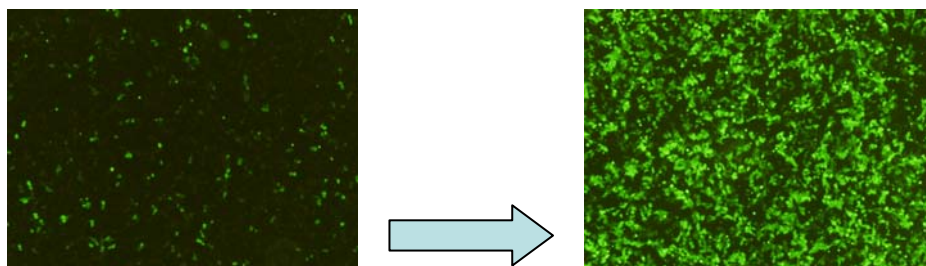
図 1. メトフォルミン刺激による糖産生抑制作用

(H4IIEC3 細胞を用いることで、メトフォルミンによる糖産生抑制作用が作用濃度に依存して観察され、1mM の濃度でほぼ最大の活性が認められた。)

ii. 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

メトフォルミンはその作用機序も標的分子も不明であるが、広く臨床現場で処方されている。見出したラット肝臓由来の細胞系 (H4 IIEC3 細胞株) を用いることでメトフォルミンの作用機序の解明と新たな糖尿病治療薬を見出すための創薬標的の探索が可能となる。そのためには、この細胞に対して細胞機能を損なうことなく遺伝子や siRNA を高い効率で導入することが必要である。しかし、従来の方法では導入効率が数%と極端に低いことが明らかとなった(図 2)。そこで、「gain-of-function」及び「Loss-of-function」解析の大前提となる高い効率での導入を可能とする技術を開発した。具体的には、市販済みで入手容易なものから新規に合成したものまでを含めて導入試薬とカルチャープレートのコ

ート剤等のスクリーニングを実施し、最も仕様の優れたものについて詳細な条件の検討を行った。その結果、新規な化学構造の導入試薬 (KG6) を見出し、遺伝子で 70%以上(図 2)、siRNA で 90%以上(図 3)の高い効率での導入を可能とした。これは蛍光タンパク遺伝子 (GFP) および蛍光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。



従来法	導入試薬	開発技術
< 10%	コート剤	> 70%
(FACS 測定)	濃度比、添加剤 時間、など	(FACS 測定)

図 2. 蛍光タンパク遺伝子(GFP)の導入技術開発

(蛍光顕微鏡および蛍光強度計測による FACS ヒストグラムにより導入効率を算出した。)

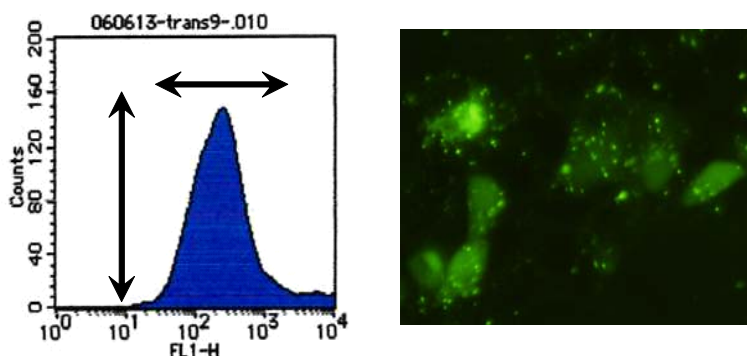


図 3. 蛍光標識オリゴ核酸 (siRNA) の導入技術開発

(H4IIEC3 細胞に KG6 を導入試薬として蛍光標識オリゴ核酸をトランスフェクションした際の FACS ヒストグラム (左) と蛍光顕微鏡像 (右))

次に、蛍光標識オリゴ核酸を用いたフローサイトメトリーの実施例について述べる。導入試薬として HiPerfect、-DoFect-GT1、LF2000、EP、KG6 および KG6/EP を用い、これら 6 種類について導入効率を比較検討した。検討した導入試薬の中で KG6 の導入効率が最も高く、90%以上の細胞に蛍光標識オリゴ核酸の導入を可能とした。KG6 の FACS ヒストグラムは正規分布を示したが、LF2000 および -DoFect-GT1 のヒストグラムは、明確なピークの無いブロードな分布を示した。

KG6 は、蛍光標識オリゴ核酸を高い効率で細胞導入することができるが、取り込まれた蛍光物質はその殆どがエンドゾームに留まっていた。即ち、取り込まれた蛍光物質が KG6 に結合したままエンドゾームから遊離できないことを示唆している。一方、市販の導入試薬である FL2000 を用いた場合は、取り込まれた蛍光物質は細胞質に広く分布しており、蛍光物質がエンドゾームから細胞質へスムーズに遊離することを示唆している。KG6 の抱えるこの問題を解決するために、KG6 にエンドポーターを混ぜることで細胞内に取り込まれた蛍光物質がエンドゾームから遊離するかについて検討したところ、期待したように KG6+エンドポーターでの細胞導入によって LF2000 と同様に蛍光物質が広く細胞質に分布するようになった。

開発した新規な導入試薬 KG6 の細胞障害性について検討したが、細胞毒性は検出できず、開発した技術全体が細胞機能へ悪影響を与えることはなかった。

iii. 導入された遺伝子もしくは siRNA の機能検証技術の開発

導入遺伝子や siRNA の機能は、細胞機能の変化を反映する生物活性変化や遺伝子発現レベルの変化などを測定、解析することで評価される。そのため、表現形としての細胞機能の指標を的確に定めることが重要となる。本研究開発で用いたラット肝臓由来の細胞は薬剤やホルモンの刺激に応答して糖産生能を変化するという表現形を持つ。この細胞系を用いて、本研究開発では3つの指標による薬剤・遺伝子・siRNA の機能を計測する評価系を開発した。第一に、導入された遺伝子や siRNA の機能をそれらに起因する糖産生の変化量として直接的に計測する方法、第二に、遺伝子や siRNA の機能をメトフォルミン薬効（メトフォルミン刺激による糖産生抑制作用）への影響量としてメトフォルミン薬効の変化量を指標として用いる方法、第三に、メトフォルミン刺激によるリン酸化マーカーの変化を指標とする方法（メトフォルミン薬効計測の2つ目の方法）である。第一の方法では糖産生経路に直接的もしくは間接的に影響を与える遺伝子や siRNA の機能の評価することが可能となる。第二の方法では作用機序と標的の全体像が不明であるが治療薬として明確なメトフォルミンの直接的な薬効に関与する遺伝子や siRNA を探索することが可能となる。さらに第三の方法は第二の方法の改良版であり、メトフォルミンの薬効を反映するリン酸化シグナルの変化量に基づく評価方法であり第二の方法よりも迅速な評価が期待され、細胞のグルコース産生量を直接測定する方法が有する再現性や安定性が確保しづらいという欠点を補償する意味を持つ。これら3つの検出方法を用いて siRNA を用いた「loss-of-function」解析技術を開発した。

第一の方法では、糖産生経路の律速酵素である PEPCK の機能を検証することができた。即ち、PEPCK siRNA の導入により、用量依存的な PEPCK mRNA およびタンパク質の発現抑制とそれに伴う糖産生抑制が見られた。これは PEPCK が糖産生に関与する重要な分子であることを「loss-of-function」解析により検証可能であることを示している。

第二の方法では、物質の細胞外から細胞内への輸送に関与するトランスポーターの1つであるオーガニックカチオントランスポーター1 (OCT1)の機能を検証した。即ち、生体肝細胞と同じく H4 IIEC3 細胞では OCT1 mRNA が発現しており、OCT1 の発現を siRNA により抑制することでメトフォルミンの薬効が解除される現象を見出した。これは、メトフォルミンの作用機序に OCT1 が重要な分子として関与していることを「loss-of-function」解析で検証したことを意味する。即ち、メトフォルミンが

OCT1 により細胞内に能動的に取り込まれていることを示唆している。この方法論を用いれば、例えば siRNA ライブラリーを用いることでメトフォルミン薬効に深く関与する分子を探索可能であり、創薬研究における有用な標的遺伝子或いはパスウェイ関連遺伝子のスクリーニング技術であることを示している。

第三の方法は、遺伝子や siRNA の機能をメトフォルミンの薬効を反映するリン酸化シグナルの変化量として捉えることで評価を行う方法である。そのため先ず、H4 II EC3 細胞系におけるメトフォルミン薬効のリン酸化マーカーの探索を行った。具体的には、リン酸化酵素（キナーゼ）の基質とされる 426 種類のペプチド群からなるペプチドアレイを用いて、薬剤刺激の有無によるリン酸化活性の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(図 4 A)。その結果、薬剤刺激に応答して変化するリン酸化シグナルを検出していると考えられるペプチド性プローブを見出した(図 4 B、C)。さらに、メトフォルミン刺激による該ペプチド性プローブのリン酸化シグナルの変化は、AMPK (AMP キナーゼ) の活性化に起因して観測されたものと推察された。

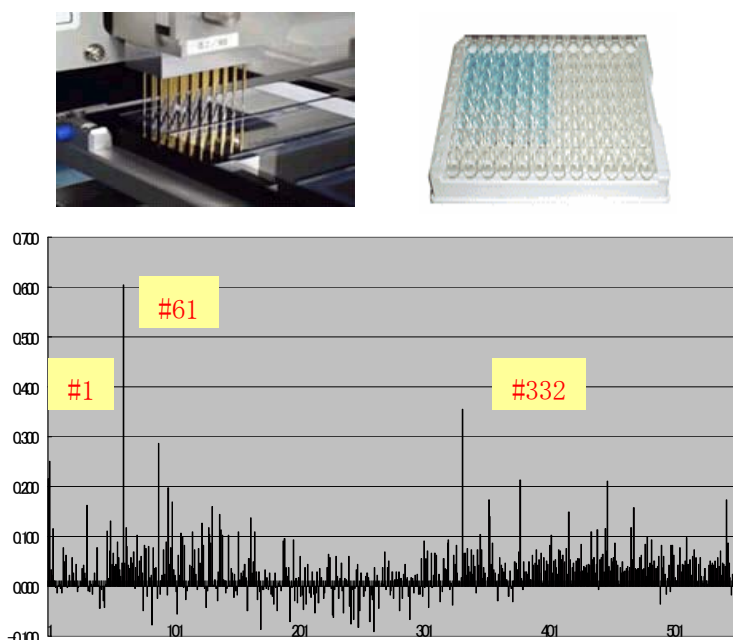


図 4 A. メトフォルミン薬効のリン酸化プロファイリング

(426 種類の基質ペプチドについて、メトフォルミン刺激によるリン酸化レベルの変化を縦軸にとり標記した。幾つかのペプチドにメトフォルミン応答性の可能性が示唆された)

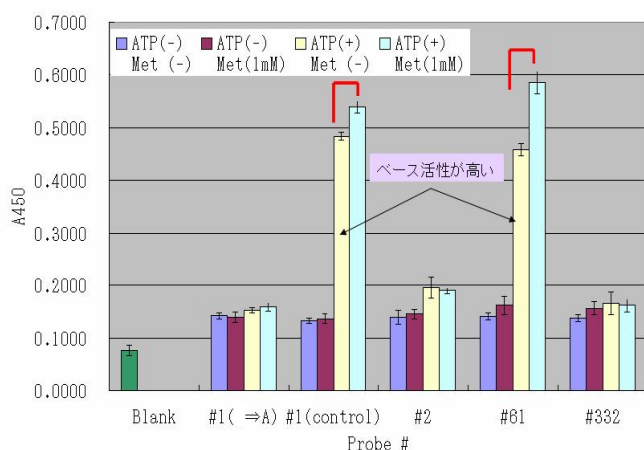


図 4 B. メトフォルミン応答性リン酸化
マーカー探索

(ATP の添加・無添加によるリン酸化レベルの変化とメトフォルミン添加・無添加でのリン酸化レベルの変化を観察した。ペプチド No.1 と No.61 を選択。)

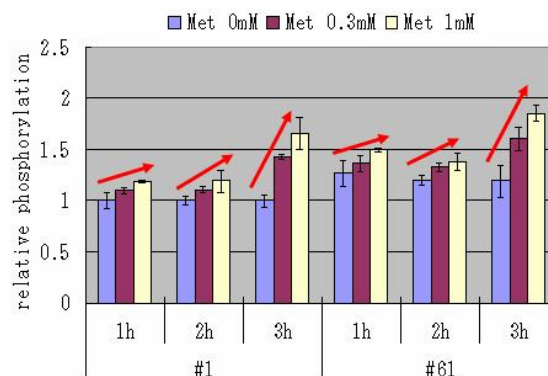


図 4 C. メトフォルミン応答性
リン酸化マーカー

(刺激時間に依存したメトフォルミン応答性の亢進を観察。)

以上より、二つの成果を得ることができた。第一にカルチャープレート型細胞アレイ技術により siRNA を使った「loss-of-function」解析で特定の分子（遺伝子・タンパク）の機能を検証可能な技術を開発した。第二にリン酸化アレイシステムを使ったリン酸化プロファイリングが可能となった。

iv. 開発技術の妥当性検証のための技術の開発

上述の開発技術により、特定の分子（遺伝子・タンパク）の機能を細胞レベルでの「loss-of-function」解析により検証可能となった。これは新たな創薬技術として提供されるが、その妥当性と汎用性は大多数の分子を相手としたゲノムワイドな「loss-of-function」解析を可能とすることで検証される。

本研究開発で用いている H4 II EC3 細胞株はラットの肝臓由来の細胞株であるが、ラットのゲノム情報の確かな整備は今後の進展を待たなければならない状況にある。そこで、本来は全ゲノムに対応する siRNA ライブラリーを用いるべきところを、肝臓における糖新生・解糖系酵素およびその細胞内シグナル伝達ネットワークに関与するキナーゼやフォスファターゼなどを含む siRNA ライブラリーセットを用いて、開発技術による「loss-of-function」解析を行った。用いた siRNA ライブラリーセットに含まれる siRNA プローブの総数は約 5400 であり、技術の汎用性を検証するには十分な数となる。機能評価のための指標として糖産生能変化量を用いた。このため糖新生の律速酵素である PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) の siRNA を positive control として用い、この siRNA による糖産生抑制作用をヒット判定の基準とした。このスクリーニングの結果および平行して実施した細胞毒性評価の結果、さらには定量 PCR による標的遺伝子のノックダウン効果の確認等の妥当性検証を行い、最終的にヒットとして Fbp1、PKA 及び遺伝子 X を含む 5 つの siRNA プローブを得た（表 1）。Fbp1(fructose-1,6-biphosphatase 1) は、糖新生酵素をコードする遺伝子のひとつであり、既に、遺伝子

産物である FBPase（フルクトース 1,6 ビスホスファターゼ）を創薬標的とする糖尿病治療薬の臨床試験が進行中であることが知られている。

表 1. H4 II EC3 細胞において糖産生抑制活性を示した siRNA の標的遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子名	糖新生調節酵素の発現制御活性
Prkaca	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha (PKA)	siRNA 添加で PEPCK ↓ siRNA 添加で G6Pase ↓
Fbp1	Fructose-1,6,biphosphatase 1	糖新生酵素のひとつ
遺伝子 X	X	siRNA 添加で G6Pase ↓
遺伝子 Y	Y	?
遺伝子 Z	Z	?

また、Prkaca (PKA)は、グルカゴンの細胞内シグナル生成に関わり、糖新生調節酵素の転写を促進する公知のカスケード分子として知られる。実際、PKA siRNA の導入により H4 II EC3 細胞における PEPCK mRNA レベルの低下 (図 5 A) 及び G6Pase の mRNA レベルの低下が認められた (図 5 B)。このように Fbp1 や PKA の siRNA 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と考えることができる。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、且つ、siRNA の導入により H4 II EC3 細胞における G6Pase の mRNA レベルの低下が認められることから、今後の in vivo 等での評価試験等により創薬標的としての妥当性が検証されるものと期待される。

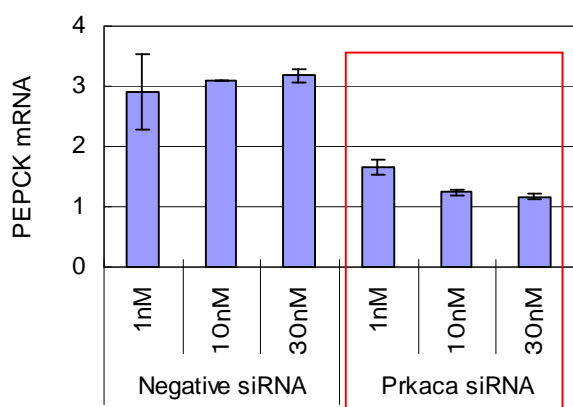


図 5 A. siRNA 導入による PEPCK mRNA レベルの変化

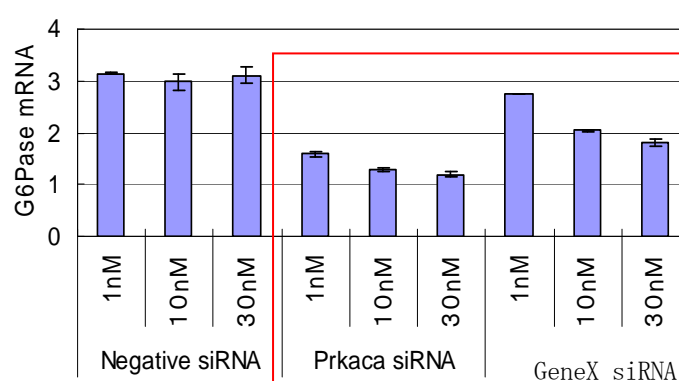


図 5 B. siRNA 導入による G6Pase mRNA レベルの変化

v. 開発技術を一般化するための技術の開発

本開発技術を一般化するための技術開発として、他のアッセイ指標あるいは他の細胞株に拡大しての適用を試みた。具体的には、まず、本プロジェクトにおいて H4IIIEC3 細胞株を用いて開発した高効率な cDNA や siRNA の導入技術を、ゲノム情報が整備されているマウス由来の細胞株に対して適用を試みた。マウスの細胞株として 3T3-L1 (前駆脂肪細胞株) 及び MC3T3-E1 (骨芽細胞様細胞株) を選択し、蛍光標識オリゴ核酸の導入技術がこれらのマウス由来の細胞株に適用可能であるかについて検討し、いずれの細胞株においても 90%以上の導入効率で蛍光標識オリゴ核酸の導入が可能であることを確認した (図6)。次いで、これら2つのマウス由来の細胞株を用いた細胞分化の評価系の構築を行った。前駆脂肪細胞株 3T3-L1 は、培地を分化誘導培地に交換することによって脂肪滴を蓄積した脂肪細胞へと分化する。この脂肪滴をオイルレッド染色することで染色度合いをアッセイ指標とする脂肪細胞分化の評価系を構築した。一方、骨芽細胞用細胞株 MC3T3-E1 は、長期培養により磷酸カルシウム沈着に基づく石灰化を惹起し骨形成能を示す。この過程でアルカリホスファターゼ活性の上昇が見られることから、アルカリホスファターゼの活性をアッセイ指標とする骨芽細胞分化の評価系を構築した。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る。

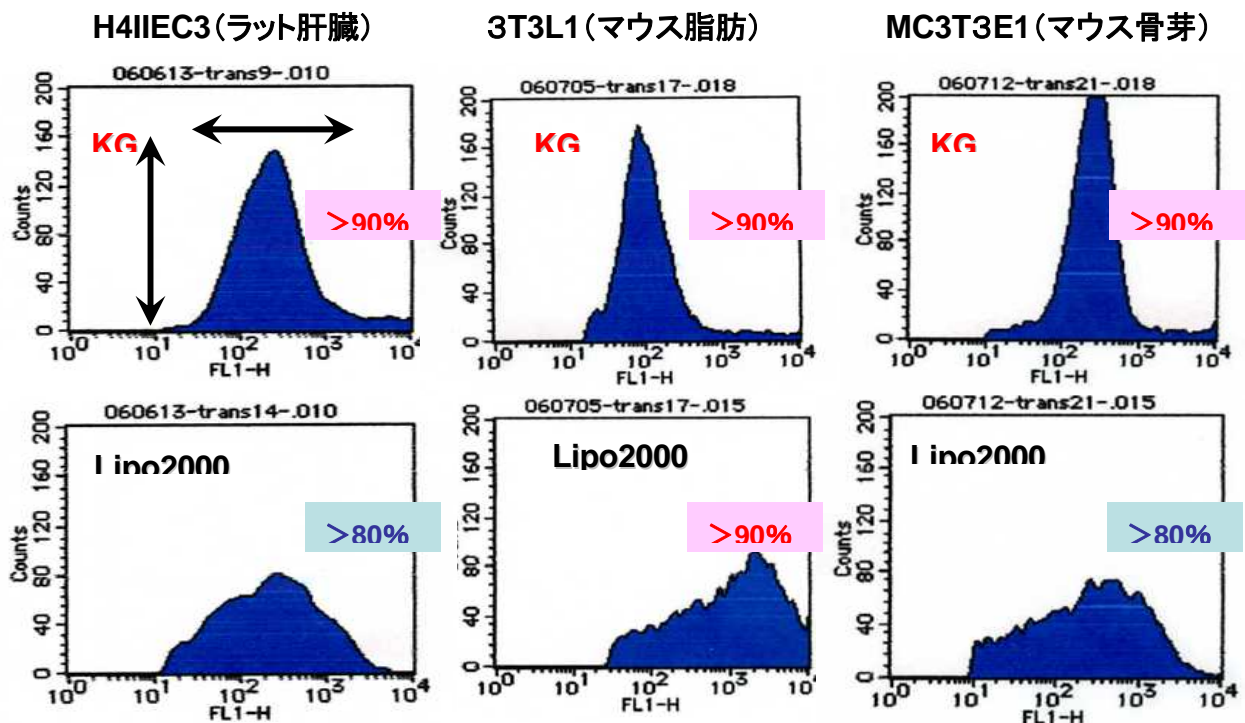


図6. 新規な導入試薬 KG6 を用いた蛍光標識 siRNA 導入技術の一般化

本技術開発研究において見出した導入試薬 KG6 は、新規な化学構造を持つものであり従来から知られている導入試薬とは明らかに異なるスペックを持つ。細胞への導入だけでなく *in vivo* でのキャリアーとしても期待されるため、KG6 のラットでの毒性試験を外部試験機関に外注することにより行った。その結果、毒性は見出されず、本試薬は *in vivo* での siRNA キャリヤーとしても期待されることが明らかとなった。

VI. 結言

これまでの成果は以下のようにまとめられる。

- 1) 高い効率で cDNA および siRNA を導入可能な新規導入試薬を開発した。
- 2) 導入効率の極端に低いラット肝臓由来 H4 IIEC3 細胞に 90%以上の効率で siRNA の導入を可能とし、メトフォルミン薬効に関連するタンパク質の機能検証を可能とした。
- 3) siRNA スクリーニングを可能とした。
- 4) リン酸化プロファイリング技術を用い薬効リン酸化マーカーを探索可能とした。
- 5) siRNA ライブラリーを用いた糖産生制御遺伝子の探索を可能にした。

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	
H17~19FY	0 件	0 件	1 件	1 件	0 件	0 件

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 (エーザイ、岡山大学)

まえがき

細胞アレイによる遺伝子機能等の解析技術開発において、細胞内に高効率に遺伝子などを導入する技術ならびに様々な刺激により活性化(変化)する細胞内情報伝達を網羅的・リアルタイムに解析する技術は、その基盤技術となる重要な技術である。さらに、多数の遺伝子を同時に細胞に導入あるいはノックダウンした場合、目的の遺伝子の発現が実際にどの程度増加しているのか(減少しているのか)を経時的・定量的かつ網羅的に解析する技術が必要となる。

本研究開発は、我々が保有する基盤技術、ポリアルギニンによる蛋白質導入法、膜透過性ペプチド核酸(PNA)を利用した遺伝子導入法、リン酸化プロテオーム解析法ならびに定量的質量分析法を応用し、以下の細胞モニタリング技術の研究開発を行うことを目的とする。

- I. 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。
- II. 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。
- III. 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。
- IV. 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。

1. 研究開発の成果と達成状況

(1) 研究開発の成果

I. 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。

pEGFP プラスミドベクターにハイブリダイズし、かつベクター機能を阻害しない膜透過性ペプチド核酸(PNA)の設計・合成を行った。DNA 結合能、解離定数、CD スペクトラム、Tm 値等を検討し、pEGFP プラスミドベクターの3165-3178番のcDNAに結合する膜透過性PNAが最も効果的であった。本PNAとpEGFPベクターを試験管内で反応させ、その後培地内に添加することにより、293細胞ならびにHela細胞にpEGFPベクターを導入・蛋白発現できることを確認した。両細胞とも発現効率は60%以上であった。以上のように本研究で開発した膜透過性PNAを利用した遺伝子導入法が、細胞アレイ上細胞への遺伝子導入法として有効であることが示唆された。TATペプチドにRNA結合蛋白質を付加した2本鎖RNAに結合できる膜透過性蛋白質の開発を行った。この蛋白質をsiRNAと試験管内で反応させ複合体を形成することを確認した後、神経膠腫由来培養細胞の培地に添加し、24時間後siRNAの細胞内導入効率についてsiRNAに付加した蛍光色素(Cy3)を共焦点顕微鏡

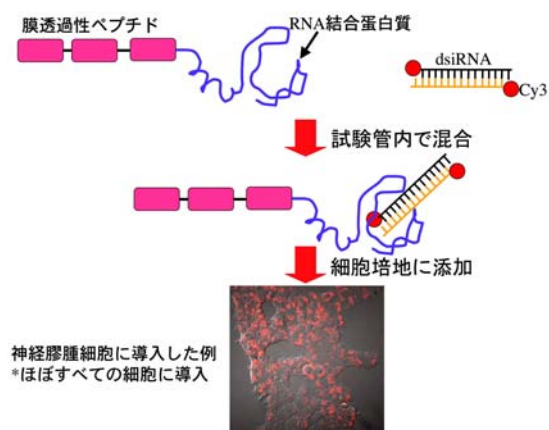


図1 タンパク質導入法を利用したsiRNA導入法の開発

にてイメージング解析を実施した。その結果、80%以上の脳腫瘍細胞に siRNA が導入されていることを確認した (図1)。

一方、コントロールの siRNA 導入試薬であるリポフェクタミン 2000 では、約 50%の細胞への導入が認められた。また、ラミニンに対する siRNA を用いてそのノックダウン効果について検討した。コントロールの細胞と比較して、発現量が 20%まで抑制されていた。さらに初代培養神経細胞を用いて同蛋白質の siRNA 導入効率・遺伝子発現ノックダウン効果について検討した。内因性蛋白質ならびに強制発現させた外来性蛋白質のいずれの蛋白質発現もコントロール細胞内の発現の 30%程度まで抑制することに成功した (図2)。以上のように、従来の技術より高効率に siRNA を培養細胞に導入する技術開発に成功した。

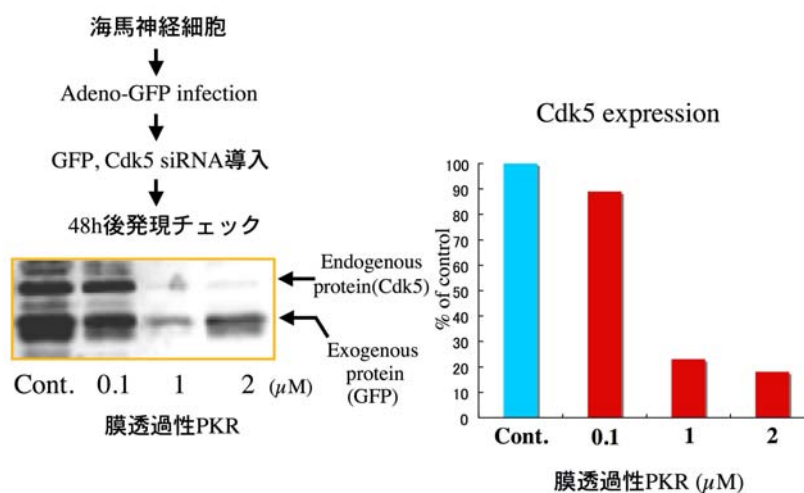


図2 新規siRNA導入法によるノックダウン結果

この新しく開発した遺伝子ならびに siRNA 導入技術は、初代培養細胞にも高効率に遺伝子、siRNA を導入することができるが、細胞内で導入した遺伝子、siRNA が機能するためには高濃度のポリアルギニン付加蛋白質を導入する必要があることが判明した。これは、新技術で導入された遺伝子、siRNA の大部分はマクロピノソーム内に取り込まれ、その後ライソゾームにて分解されることが原因であることを突き止めた。そこで、マクロピノソームから導入した蛋白質、遺伝子、siRNA を効率よく離脱させる技術開発を行った。マクロピノソームから離脱する技術として2つの技術開発に成功した。

i. 440nm 波長レーザー照射によるマクロピノソームからのリリーシング。

我々は、480~400nm 波長レーザーを培養皿上の細胞に照射することにより、細胞内に導入された膜透過性 PNA がマクロピノソームからリリーシングされることを見出していた。本研究開発では、最もリリーシング効果が高いレーザー波長について検討した。その結果、440nm の波長照射が最もリリーシング能力が高かった。具体的には、1 μM 膜透過型 PNA と 1 μM pEGFP プラスミドベクターを 293 細胞ならびに Hela 細胞の培地に添加し、480 nm 波長を 10 秒間連続照射した。照射 24 時間後、GFP の発現について共焦点顕微鏡にて検討したところ、照射部では、ほぼすべての細胞において GFP の発現が認められた (図3)。

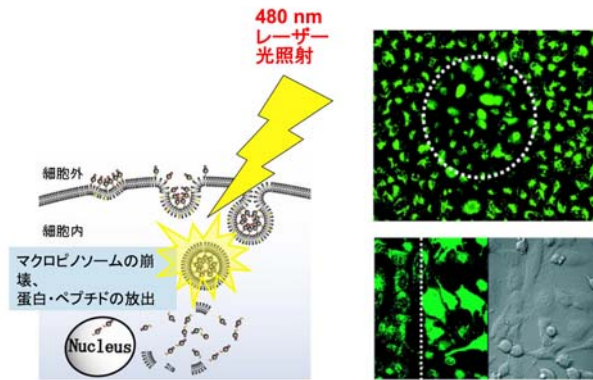


図3 480nm波長レーザー照射による導入蛋白質の
マクロピノソームからのリリースング技術開発

ii. マクロピノソーム放出ペプチドによるマクロピノソームからのリリースング技術の開発

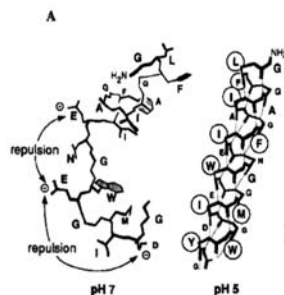
インフルエンザウイルスが発現するヘマグルチニンサブユニットは、この23個からなるペプチドで、pHが7付近では細胞膜に対して影響を及ぼさないが、pHが低下すると、細胞膜を壊す能力を有する。そこで、マクロピノソーム放出ペプチド (GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG) に9個のアルギニンおよび2個のグリシンリンカーを付加した膜透過型マクロピノソーム放出ペプチド (RRRRRRRRRGGLFEAIEGFIENGW-EGMIDGWYG) を合成した。1 μ M 膜透過型 PNA (FITC 付加) および2 μ M 膜透過型マクロピノソーム放出ペプチドを293細胞培養培地に添加し、リアルタイムイメージングでその細胞内局在について、検討した。膜透過型マクロピノソーム無添加群では、膜透過型 PNA 添加1時間後で、ほとんどの膜透過型 PNA は、細胞膜直下およびマクロピノソームに局在していた。一方、膜透過型マクロピノソーム添加群では、1時間後に膜透過型 PNA が細胞体から核に発現していた。すなわち、マクロピノソーム放出ペプチドが膜透過型 PNA のマクロピノソームからのリリースングに有効であることが示唆された (図4)。

インフルエンザウイルスのヘマグルチニン
HA2サブユニットのN末端ペプチド
(GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG)

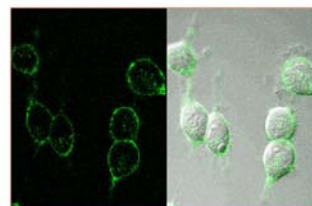
:

pH感受性エンドソーム崩壊機能を有する。

→ pH 5.0付近で膜破壊作用あり
pH 7.0付近では膜破壊作用なし



11R-p53



11R-p53
+
HA2 peptide

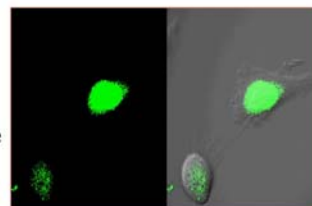


図4 HA2ペプチドを用いたマクロピノソーム
リリースング技術開発

新しく開発した HA2 ペプチドを用いたマクロピノソームリリーシング技術の効果は優れているが、細胞毒性があることが判明した。HA2 ペプチドは濃度依存的に細胞増殖を抑制したり、また細胞死を誘導したりした(図5)。そこで、細胞毒性の少ないマクロピノソームリリーシング技術開発を行った。肝炎ウイルスが発現する 12 アミノ酸残基から成るトランスロケーションドメイン (HBV-TLD: LLNQLAGRMIPK) は、肝炎ウイルスが細胞内に取り込まれた後、エンドソームから離脱する時に機能するペプチドである。そこで、この HBV-TLD ペプチドをポリアルギニンが付加した p53 蛋白質に付加し、p53 転写活性について HA2 ペプチドを付加した p53 蛋白質と比較検討した(図6)。0.1 μ M の HA2 を付加した 11R-p53 は、1 μ M 11R-p53 より p53 転写活性が高かった。さらに 0.1 μ M HBV-TLD を付加した 11R-p53 は、0.1 μ M HA2-11R-p53 より転写活性が高いことが明らかになった(図7)。

HA2ペプチドによるマクロピノソームリリーシング法は、
増殖抑制・細胞死などの細胞毒性を有する。

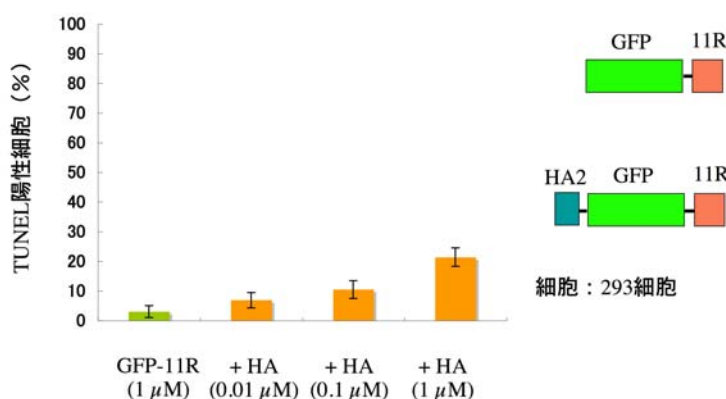


図5 HA2ペプチドによるマクロピノソームリリーシング法の問題点

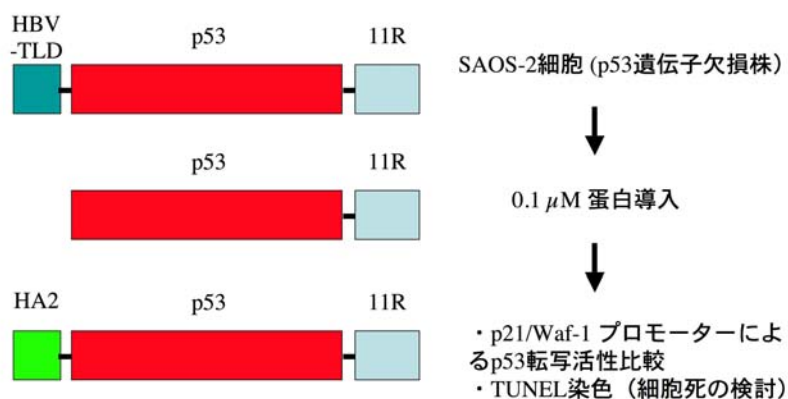


図6 肝炎ウイルスの translocation domain を利用したマクロピノソームリリーシング法の開発

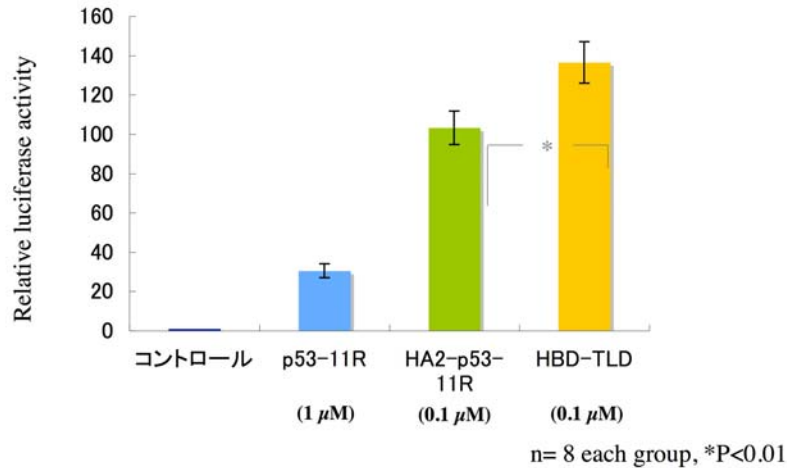


図7 肝炎ウイルスの translocation domain (HBD) は、HA2よりマクロピノソームリリーシング効果大きい

このことは、HBV-TLD をポリアルギニン蛋白質に付加すると、蛋白質、遺伝子、siRNA が効果的にマクロピノソームから離脱し、機能することを示唆するものである。

さらに、HBV-TLD ペプチドが細胞毒性を有していないか検討した。GFP 蛋白質にポリアルギニン、HA2 ペプチドもしくは HBV-TLD ペプチドを付加した蛋白質を作製し、Hela 細胞に 1μM の濃度でそれぞれの蛋白質を導入し、細胞死誘導について TUNEL 染色にて判定した。その結果、HBV-TLD は、HA2 ペプチドと比較し、有意に細胞毒性が少なかった (図8)。1μM HBV-TLD を付加した 11R-p53 の細胞毒性は、何も付加していない 11R-p53 と同程度であった。

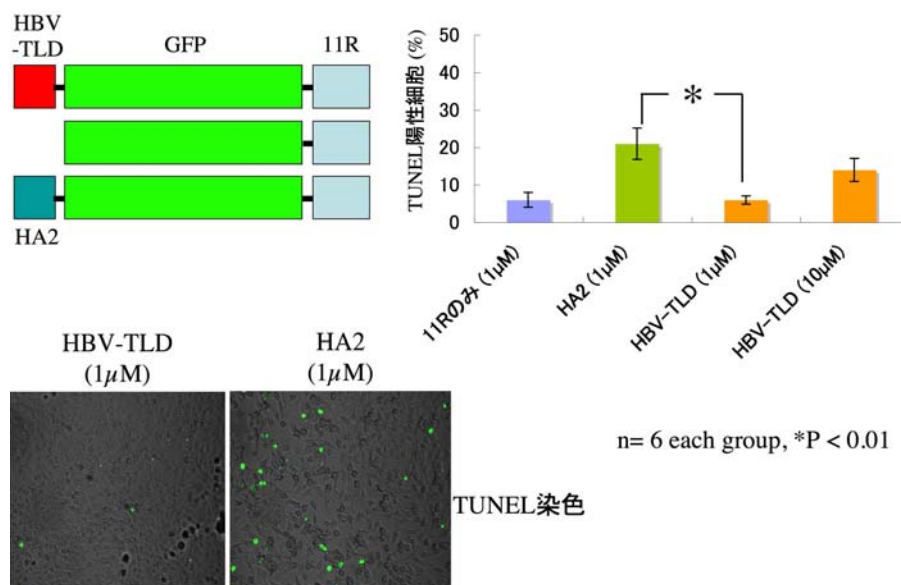


図8 細胞毒性試験

以上の結果より、HBV-TLD ペプチドは、蛋白質導入法で導入した遺伝子、siRNA ならびに蛋白質

をより効果的に細胞内で機能させることができることが明らかになった。本開発技術は、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 導入技術の高機能化に寄与することが示唆された。

II. 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。

78 種類の様々な組織・器官から樹立された各種細胞に対するポリアルギニンによる蛋白質導入法の蛋白導入効率について検討した。実験方法としては、緑色蛍光蛋白質 (GFP) に 11 個のポリアルギニンを付加した蛋白質を大腸菌で発現させた後精製した。最終濃度 1 μ M になるよう同蛋白質を各細胞の培養液中に添加し、24 時間後共焦点顕微鏡で観察することにより各細胞に対する導入効率を検討した。その結果、86%の細胞種では、50%以上の細胞に蛋白質が導入されたが、14%の細胞腫では導入効率が 50%未満であった。導入効率が悪い細胞腫は、幹細胞、前立腺由来の細胞腫、ならびに一部の膵臓由来の細胞腫であった。また導入効率が 50%未満であった 14%の細胞腫の内、7%の細胞では、細胞内への導入は認められたが、マクロピノソームに取り込まれたまま、細胞内に放出されていない像が認められた。残りの 7%の細胞種では、導入効率が 50%未満であった (図 9)。

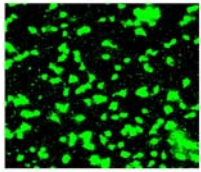
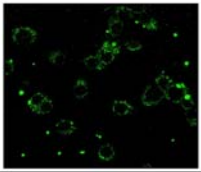

	導入効率	GFP蛋白 イメージング像
50%以上の細胞 に導入が認めら れた細胞種数	74/86 (86%)	
細胞内に導入は 認められたが、小 器官内への蓄積 が認められた細 胞種数	6/86 (7%)	
細胞内への導入 が50%未満で あった細胞種数	6/86 (7%)	

図9 各種細胞に対するタンパク質導入法による蛋白導入効率

また、幹細胞ならびに前立腺由来細胞への蛋白質導入の効率が悪い原因を解明した。これら細胞株では、細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現が少ない、もしくはヘパラーゼの発現が高いことが明らかになった。蛋白質導入法による蛋白質導入の原理として、まずポリアルギニンが細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合することが最初のステップである。幹細胞ならびに前立腺由来細胞では、元来ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現が少ない、あるいはヘパラーゼ活性が非常に高いため同複合糖質の糖鎖部分が分解されているためにポリアルギニンが細胞表面に結合できなくなると考えられる。その結果、蛋白質が細胞内に導入されないことが判明した。ポ

リアルギニン以外にエイズウイルスが発現している TAT 蛋白質の Protein transduction domain (PTD) を用いた蛋白質導入法を用いても幹細胞、前立腺由来細胞への蛋白質導入効率は、他の組織・臓器由来の培養細胞と比べ導入効率は悪かった。

以上の結果より蛋白質導入法は、各種細胞に対する蛋白質導入効率の点から細胞アレイに蛋白質を直接導入し機能解析を行うのに良いツールであることが示唆された。さらに、導入効率が悪い細胞腫とそのメカニズムも明らかにすることができたので、このメカニズムを利用することによりすべての細胞に蛋白質導入法は応用できる可能性が示唆された。

ポリアルギニンによる蛋白質導入法のセルアレイ化技術開発を産総研グループとの共同研究で実施した。ポリアルギニンを付加したペプチドの固相化方法として二つの方法を試みた。一つめが、トランスフェクションアレイ (TFA) 技術の転用であり、塩で固着させる方法を試みた。また二つめの方法として生分解性ポリマーのマトリックス材料を利用して固相化を試みた。TFA 技術の転用によるポリアルギニンペプチドの固相化は、まずスライドを PLL でコーティングし、乾燥後 3mM ペプチド溶液を 1.5mM に水で希釈し、プリントした。細胞播種 24 時間後、細胞内へペプチドが導入されているか蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、多数の細胞においてポリアルギニンペプチドの導入が認められたが、ペプチドの固相化をしていない培養皿上の細胞においてもポリアルギニンペプチドの導入が認められた (図 10)。すなわち、固相化したペプチドが液相に溶出していることが示唆された。

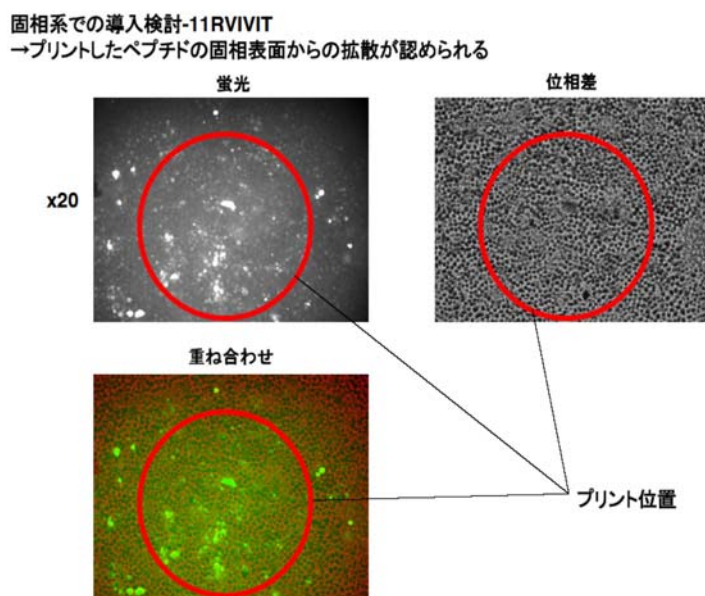


図10 ペプチドが固相表面から拡散している

生分解性ポリマーを用いた場合でも同様にポリアルギニンペプチドの液相への溶出が認められた。以上の結果より、ポリアルギニンペプチドは、易水溶性のため固相化が困難であることが明らかになった。すなわち、蛋白質導入法をセルアレイに応用するためには、難水溶性のポリアルギニンペプチド蛋白質導入法の開発が重要であることが判明した。そこで、ポリアルギニンペプチドに脂溶性を付加した蛋白質導入法の開発を行った。ピレンブチレートは、4 つのベンゼン環と酸性基のカルボキシ

ル基からなる化合物であり、難水溶性である。このピレンブチレートとポリアルギニンを付加した蛋白質を混合すると、ポリアルギニンを付加した蛋白質、ペプチドは難水溶性になる。この混合物を細胞培養液中に添加すると、ポリアルギニン蛋白質が細胞内に速やかに導入された (図 11)。すなわち、ピレンブチレートを用いた新しい蛋白質導入法が、蛋白質導入法のセルアレイ化に有用であることを示唆することができた。

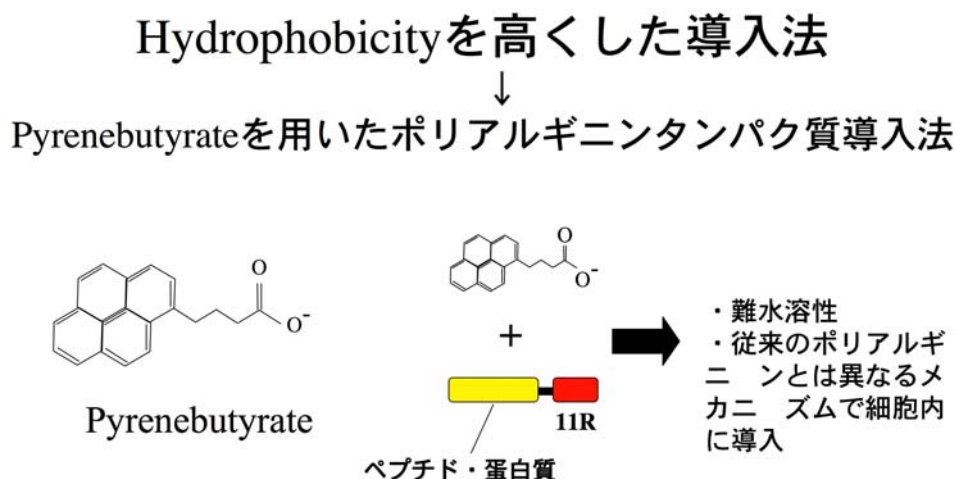


図11 ポリアルギニンを利用した新しいペプチド・タンパク質導入法の開発

III. 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。

NEDO 健康安心プログラムの一つバイオ・IT融合機器開発プロジェクトに我々は参画して、バイオインフォマティクスと融合した、先進プロテオミクスプラットフォームの創造と称して、プロテオミクスに必要な種々のツールを開発してきた。その一つにリン酸化プロテオミクスがある。翻訳後修飾解析はプロテオミクスの得意領域の一つであり、中でもリン酸化修飾は研究者人口がもっとも多い分野である。なぜならタンパク質はリン酸化されることによって酵素活性や細胞内での局在、核酸や他のタンパク質との相互作用を変えることがあり、その情報が連鎖的に他の物質に伝わり、結果としてその細胞にある種の表現型・生物活性の変化を生み出す。従って、いつ、どのタンパク質の、どのアミノ酸がリン酸化され、そしていつ脱リン酸化されるのかを知ることは、そのタンパク質、そしてその細胞の機能を解析する上で重要な研究の一つでもある。現在のプロテオーム解析の主力であるMSは分子量の違いを認識できる。しかしリン酸化部位を効率的に同定するためには、リン酸化ペプチド (タンパク質) のみを網羅的に精製することが必要になる。リン酸基に対して三価の鉄イオンが高い親和性を有することは古くから知られており、そのため種々の金属キレート樹脂や、酸化チタン、ジルコニアなどを使ってリン酸化ペプチドの濃縮が試みられてきた。我々は樹脂に工夫を施すことなく、試料溶媒を強酸性かつ高濃度アセトニトリル溶媒にすることによってリン酸化ペプチドの精

製効率を高めることができた。しかし実試料には ATP や AMP、NADPH などヌクレオチド関連物質、それにリン脂質などが非常に多く含まれており、その含量はリン酸化タンパク質の量よりもはるかに多い。従ってこれらを除かない限り、金属キレート樹脂の負荷量を大幅に超えてしまう。そこで我々は、タンパク質レベルで限外ろ過、ペプチドレベルで脱塩操作を行った。これにより実試料からリン酸化ペプチドの精製がルーチン化された。実際マウス脳からの抽出物に対して、どの程度リン酸化ペプチドが精製できるか、20 回繰り返したところ、リン酸化ペプチドが同定される割合は下記の図 12 に示したように平均で 31.3%(SD 13.3)であった。リン酸化ペプチドは質量分析で検出できても同定できる割合は高くないことから、実際には半分程度がリン酸化ペプチドであろうと思われる。

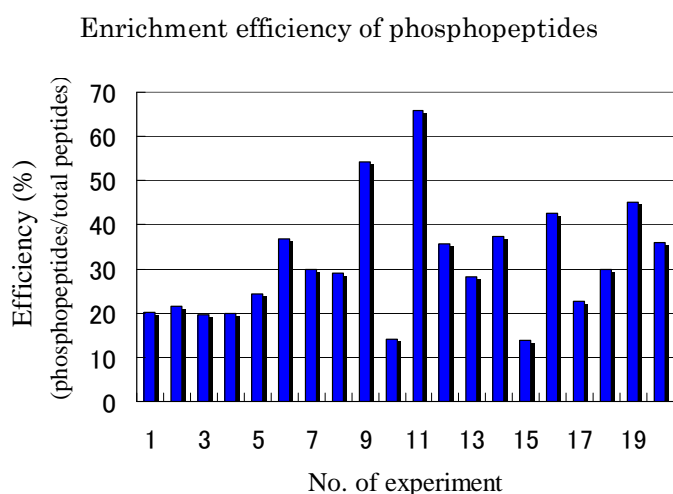


図 12 リン酸化ペプチドの精製効率 (n=20)

次に偽陽性を減らす試みを行った。通常質量分析によるタンパク質の同定は MS/MS スペクトルに対して種々の検索エンジンが使われる。現在世界中で汎用されている Mascot, Sequest, X!Tandem の信頼度は同程度と思われる。そこで偽陽性を減らすために、通常 1 種類のタンパク質に対して最低 3 つ以上の異なるペプチド断片を同定すれば、真に同定したとみなすなどの基準が設けられようとしている。しかし発現量が少ないタンパク質の場合は複数種類のペプチド断片を同定できることは稀であり、リン酸化タンパク質の場合、リン酸化ペプチド 1 つ同定することが最重要であるため偽陽性排除は容易ではなかった。そこで我々は濃縮したリン酸化タンパク質群をアルカリホスファターゼ処理の有無で分析し、同定されたペプチド配列のスコア (同定の確からしさ) を比較した。その結果、元々非リン酸化のペプチドはホスファターゼ処理というステップを増やすことにより回収率が低下するためスコアも低下傾向にあった。しかしリン酸化ペプチドの場合は、リン酸基を外すことで MS/MS スペクトルの質が上がるため、ホスファターゼ処理によってスコアが改善した。このことはホスファターゼ処理の有無で結果を比較することによって同定されたペプチド配列の確からしさを確認することになる(図 13)。

Comparison of Mascot score between phospho- & de-phosphopeptides

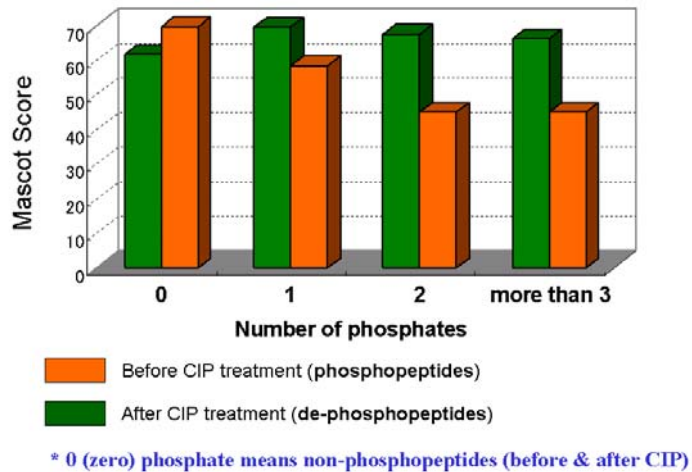
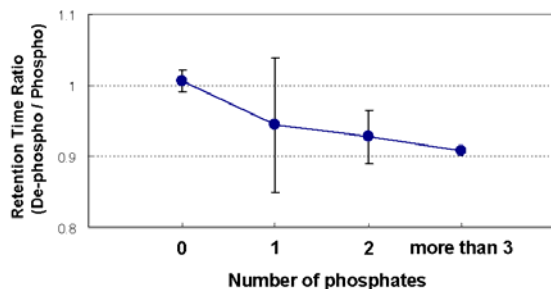


図 13 リン酸基の有無による検索スコア値の変化

さらにリン酸基の有無によって HPLC での保持時間を比較した(図 14)。一般にリン酸化によってペプチドの極性が高くなるため逆相カラムでの保持時間が短くなると信じられていたが、以前合成ペプチドを使った検討ではそのような傾向は得られず、今回の検討でもリン酸基の有無に関わらず保持時間はほとんど変わらず、むしろリン酸基の付加によって保持時間が長くなる傾向があった。またリン酸化ペプチドの解析では折角リン酸化タンパク質を効率的に濃縮して、かつ MS/MS スペクトルにおいてリン酸化ペプチド共通に見られる特徴が認められても同定に至らない偽陰性も多い。しかしそのような場合でもリン酸基を外したペプチドなら同定できることもある。実際先のホスファターゼ処理によって新たに同定できるペプチド配列も多く見つかったことから、ホスファターゼ処理によって同定されたリストをデータベース化し、それに対してリン酸化ペプチドの同定を行うシステムと作った。しかし小さなデータベースの場合、逆に偽陽性が増えることも懸念されるため、HPLC による保持時間情報と高精度質量分析情報（質量精度 3ppm）をも考慮して同定を行った。その結果、同定数を増やすことができ（図 15）、特に一つのペプチドに複数のリン酸基が付いている場合に効果が高いことも明らかとなった(図 16)。またリン酸化セリンの割合は約 90%、リン酸化チロシンは 1-2%程度であったが、信頼性が低い同定結果では、リン酸化チロシンやスレオニンの割合が増えることもわかった(図 17)。

Difference of retention times between phospho- & de-phosphopeptides



* 0 (zero) phosphate means non-phosphopeptides (before & after CIP)

図 14 トリプシン消化ペプチドに対してリン酸基の有無による保持時間の変化

Venn diagram showing number of identified phosphopeptides from NCBI database or CIP database.

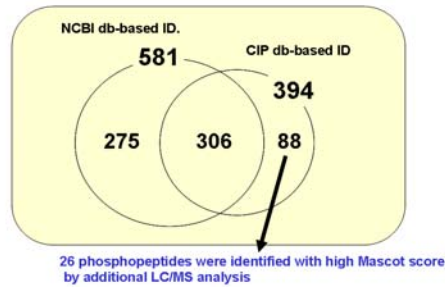


図 15 リン酸基を外してから同定を行い、それをデータベースとして利用

Distribution of phosphates number in a tryptic phosphopeptide

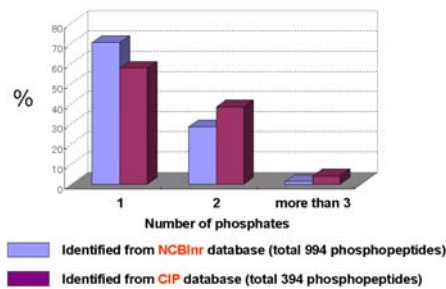


図 16 リン酸基除去データベース同定による 1 ペプチド当りのリン酸基数

Distribution of phospho-amino acids

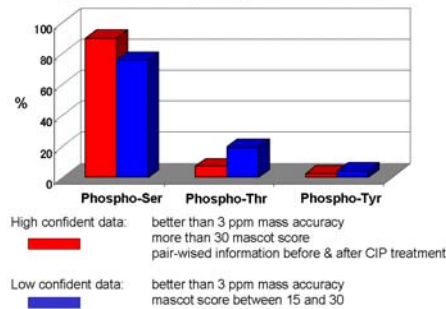


図 17 リン酸化されたアミノ酸の割合について

これまでに我々は、マウス脳から 2907 ケ所、Neuro2a 細胞から 1708 ヲ所、BAFc 細胞から 693 ケ所、HCT116 細胞から 321 ケ所、PC9 細胞から 370 ケ所、HepG2 細胞から 210 ケ所、DU145 細胞からは 224 ケ所、MCF7 細胞からは 186 ケ所、マウスのリンパ球から 354 ケ所、マウス精巣から 135 ケ所のリン酸化部位を同定した。このリン酸化に関する情報量は世界トップレベルであることは間違いないであろう。このように一度情報をカタログ化してしまい、次の研究の際に着目すべきリン酸化タンパク質を 100 種類以下まで絞り込めれば、リン酸化状態を定量 (モニター) することは難しくな

い。その方法については次 IV と共通である。またハンチントン病の原遺伝子の一つといわれている Hip1 に対する遺伝子改変マウスの脳で特異的に変化すると思われるリン酸化部位についても複数同定している。

IV. 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。

導入した遺伝子の発現量や抑制量をタンパク質レベルで確認するためには、特異的抗体が必要となる。しかし抗体が手に入らない場合、あるいはより精度の高い定量値が必要な場合、もっとも汎用されている定量法が質量分析を用いた同位体希釈法であろう。これは標的分子を安定同位体元素で置換した分子を内部標準物質として加えて、標的分子と内部標準物質とのピーク強度比により定量する手法である。予め標準品を用いて検量線を作成しておけば絶対値を求めることができる。しかし安定同位体元素で標識した内部標準物質を化学的に合成するにはコストが高くなり、特に多数の内部標準物質が必要な場合は、コストの点で実用的ではなくなる。そこで我々は先の NEDO バイオ IT 助成プロジェクトにて逆同位体希釈法を考案し特許化した(図 18)。すなわち培養細胞中に発現しているタンパク質を網羅的に安定同位体標識することは比較的容易であり、既にプロテオミクスでは多数の報告例がある。

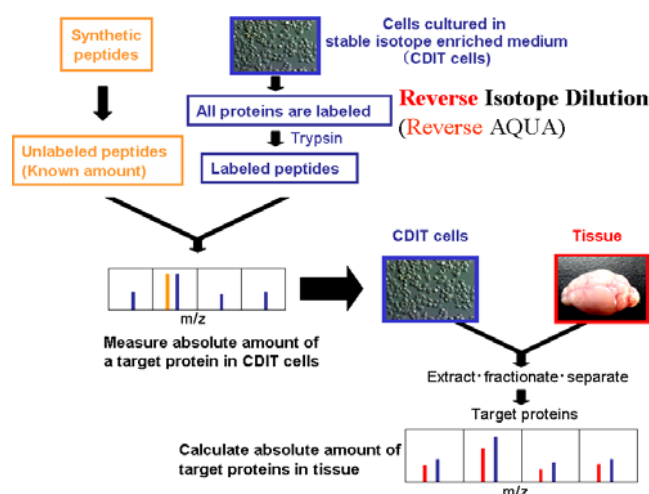


図 18 網羅的安定同位体元素標識法による絶対定量について

よってこのような安定同位体標識されたタンパク質群に対しては通常のペプチド合成により（安定同位体元素標識されていない）内部標準物質を得ることができる。そして網羅的に安定同位体標識したタンパク質群（細胞）のカタログ化をしまえば、この細胞を内部標準細胞として他の細胞の定量を行うことができる。よって我々はこれまで実際に質量分析で同定実績があるペプチド断片を選び、合計 **655 種類** のペプチド合成を行い、そのうち純度 **80% 以上** で精製できたペプチドは **398 種類**、そしてアミノ酸分析によって合成ペプチドの絶対量を求めることができたものは丁度 **300 種類** であった。これら定量済みの合成ペプチドを内部標準とした LC/MS を行い、HepG2 細胞に発現しているタンパク質の絶対量を求めることができたのは **156 種類** であった。

細胞アレイにおいて、どの細胞を使うかはおそらく研究者が興味ある細胞、あるいは目的の結果が得られると期待できる細胞を選ぶであろう。しかし細胞間で発現しているタンパク質がどの程度異なるかなどの基本情報は極めて乏しい。またバイオマーカー探索において、例えば病態と正常を比較し違いを見出すことは容易い。しかしその違いが、その疾患由来の試料全てに見られるのか (Sensitivity)、そしてその疾患特異的なのか (Selectivity) を確認すること、特に Selectivity のバリデーションは基本データの蓄積が充分でないと難しい。同様にある細胞特有の反応が見つかった場合、そのメカニズムに迫るためには、その細胞が他と細胞と何が違うのか理解しておく必要がある。

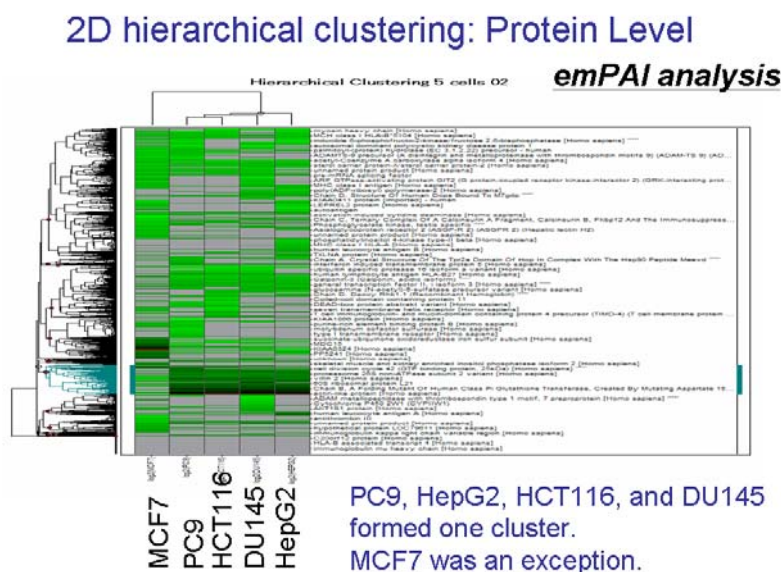


図 19 簡易定量 emPAI による各種癌細胞の発現プロファイル

このような背景から我々は種々の癌細胞のカatalog化を始めた。発現量の定量には上記逆同位体希釈法が適しているが、まだ準備段階であるため、セミ定量法である emPAI を適用した。emPAI とは発現量が多いものほど検出できる確率が高いという統計的概念を利用し、さらに emPAI と発現量が比例関係になるよう数式を変換したものである。これを使って **HCT116(大腸癌)細胞から 13123 種類、HepG2 (肝癌)細胞から 15832 種類、PC9 (肺癌)細胞から 16026 種類、DU145 (前立腺癌)細胞から 15798 種類、MCF7 (乳癌)から 17250 種類**のタンパク質を同定しセミ定量も行った。その結果、各細胞に特異的に発現していると思われるタンパク質は**HCT116細胞で 86 種類、DU145細胞で 135 種類、MCF7細胞で 214 種類、PC9細胞で 170 種類、HepG2細胞で 186 種類**であった(図 19 に各種癌細胞における発現クラスター解析結果を示した)。

予め測定したいタンパク質がわかっている、かつ上記に示した同定実績があるタンパク質については、合成すべきペプチド断片がすでにわかっているため、内部標準ペプチドを得ることは難しい。目的の研究に合わせてモニターすべきタンパク質を 100 種類程度に絞り(繰り返し測定可能ならば 100 x n 種類)、Multiple Reaction Monitoring (MRM)法を使うことによって、下記(図 20)に示すように感度は 100 倍程度向上し、定量性も 10000 程度の範囲で直線性が得られることを確認した(図 21)。

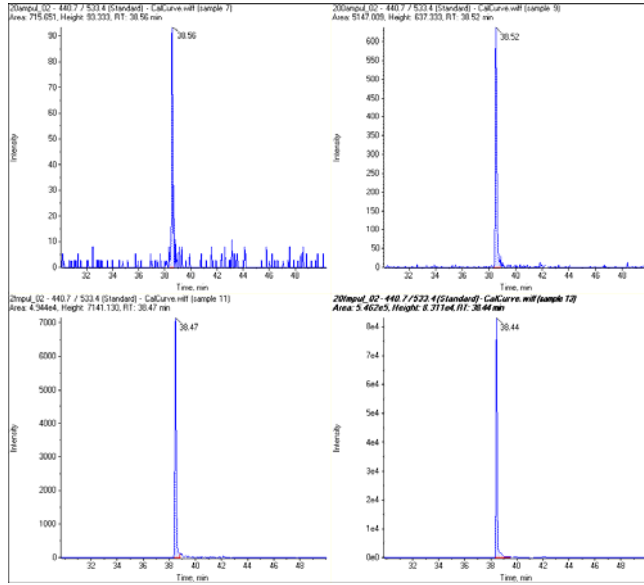


図 20 MRM 法による典型的なマスクロマトグラム

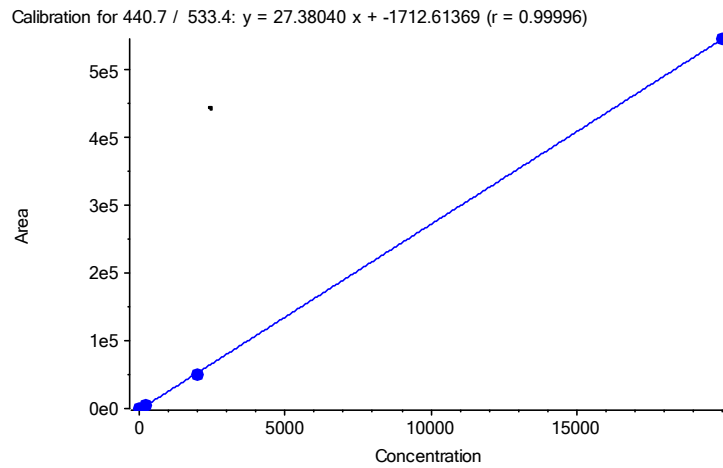


図 21 MRM 法での直線性～オミクス解析に用いる装置より 100 倍程度ダイナミックレンジが広い

特許、論文、外部発表等の件数

区分	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	
年度						
H17~19FY	0 件	0 件	0 件	12 件	12 件	0 件

IV. 実用化、事業化の見通しについて

(細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発)

1) 産業技術総合研究所 CBRC

「ターゲットバリデーションシステムのソフトウェア」

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を捉えるアルゴリズムは新規性があり一般的なものであるため、計測機器付属の既存ソフトウェアへの組み込みにより市場化が可能な段階にある。

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。

2) 産業技術総合研究所 RICE (臨海)

①細胞運動性評価チップ

本技術の実用化を目指し、企業 (2社)、東京工業大学および産総研の共同研究を開始している。さらに、企業からの資金提供型共同研究の実施体制の整備および実用化・技術移転グラントの申請を現在進めている。

ベンチャーの設立や技術移転を通じたシーズを基にした製品・サービスのイメージは以下の通りである。すなわち、本技術をベースとして創薬・医療支援システムを構築し、(i) がん転移に関わる創薬ターゲット探索および (ii) リード化合物 (小分子、抗体、ペプチド等) の薬剤評価の受託サービスへの展開を行う。これらサービスにおいては、目的に応じて探索遺伝子群を選択し、それらに対する siRNA や発現プラスミドを搭載したセルアレイを用いる。さらに、摘出がん組織から確立した細胞を用いて、(iii) 個別化された術後補助療法のための転移性評価サービスも考えられる。患者の精神的不安や経済的負担を軽減するための個別コンサルティング事業を開拓し、がんが死因第1位であり続けることが予想される高齢化社会において、人々の生活の質 (QOL) の向上に貢献する。サービス (i) と (ii) は製薬関連企業、大学、公的研究機関の研究者が、また (iii) は医療機関や患者自身が主な対象と考えられる。

3) 産業技術総合研究所 RICE (つくば)

①モータリン染色をリポーターとして利用した抗がん siRNA スクリーニング

モータリン染色を指標としたスクリーニングにより単離した抗がん siRNA は、マウスを用いた in vivo 抗がん活性の検討まで進んでいる。モータリンレポータースクリーニングは、有用な抗がん遺伝子探索法として期待できる。

②アシュワガンダを使用した抗がん剤および健康食品の開発

本研究成果を基に、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をベースとした

抗がん剤および健康食品開発を目指す。共同研究企業とともに科学技術研究機構助成金等の予算申請を行っている。

③ (がん細胞の薬剤耐性に関与する) **BST2** タンパク質の活用

BST2 は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。また、細胞表面タンパク質である **BST2** は抗体療法の候補標的である。

4) 癌研究会、協和発酵キリン

①次世代の抗がん剤治療予測システムの確立

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

本研究では既存抗がん剤のテストケースとしてパクリタキセルを用いて、感受性、非感受性の患者遺伝子発現情報と細胞アレイを用いた遺伝子機能ネットワーク解析を組み合わせた手法により、関連遺伝子を抽出し、治療効果予測ならびに感受性増強パスウェイの同定が可能であることを示した。

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、より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立を可能にし、個別化医療の実現に貢献できるものと思われる。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。

また、今後更にモデルケースを重ねる必要があるが、がん治療における既存抗がん剤を中心にした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する。

5) カネボウ化粧品

①化粧品素材の開発

本研究で見出した遺伝子の発現を増加させる化粧品素材を開発し、紫外線障害に対し新たな防御を可能とする化粧品開発を目指す。また、紫外線との関係が未報告の遺伝子やメラノサイト樹状突起形成に関わる遺伝子等にも着目し、化粧品への応用を検討する。

6) 東京大学 三宅研

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 (1. 画像解像度、2. 時間分解能、3. 装置の頑健性) が明らかになった。そこでこれらの課題を改善した装置を製作した。本装置は横河電機(株)より製品化されている (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、その容量が通常より大きいので運用上に懸念があった。しかし、大きな問題なく連続運用することができ、有用性が再認識された。

③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)

簡便な技術であり、汎用されると思うが、知財権取得は行わない。尚、本技術は既存のソフトウェア等に組み込むことが可能である。

7) 東京大学 長棟研、鷺津研

①がん細胞の浸潤を指標とした評価チップ

実用化できるほどに成熟しており、提携企業が見つかり次第実用化を進める。

②エレクトロポレーション技術

技術的には完成しており、市場化できる段階にある。しかし、製薬等の分野におけるニーズ掘り起こしと販路確保は課題である。

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、単純であるが新規性が高く、かつ、実用性を備えている。特に最小二乗法を用いる方法は実数値データをそのまま用いることができ、実用性が高いと考えている。現在、この最小二乗法を用いる方法にさらなる改良を加えた方法を開発中であり、今年中にはプロトタイプが完成する見込みである。プロトタイプをいくつかのベンチマークデータに適用して有効性が確認できれば、web サーバーもしくは別の方法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 の利用

治療法が限られる triple-negative 乳がんへの応用が期待される。