

研究開発項目毎の成果

- デバイス関連技術開発
- 時系列解析技術開発
- 応用研究

応用研究

- 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)
- 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)

応用研究

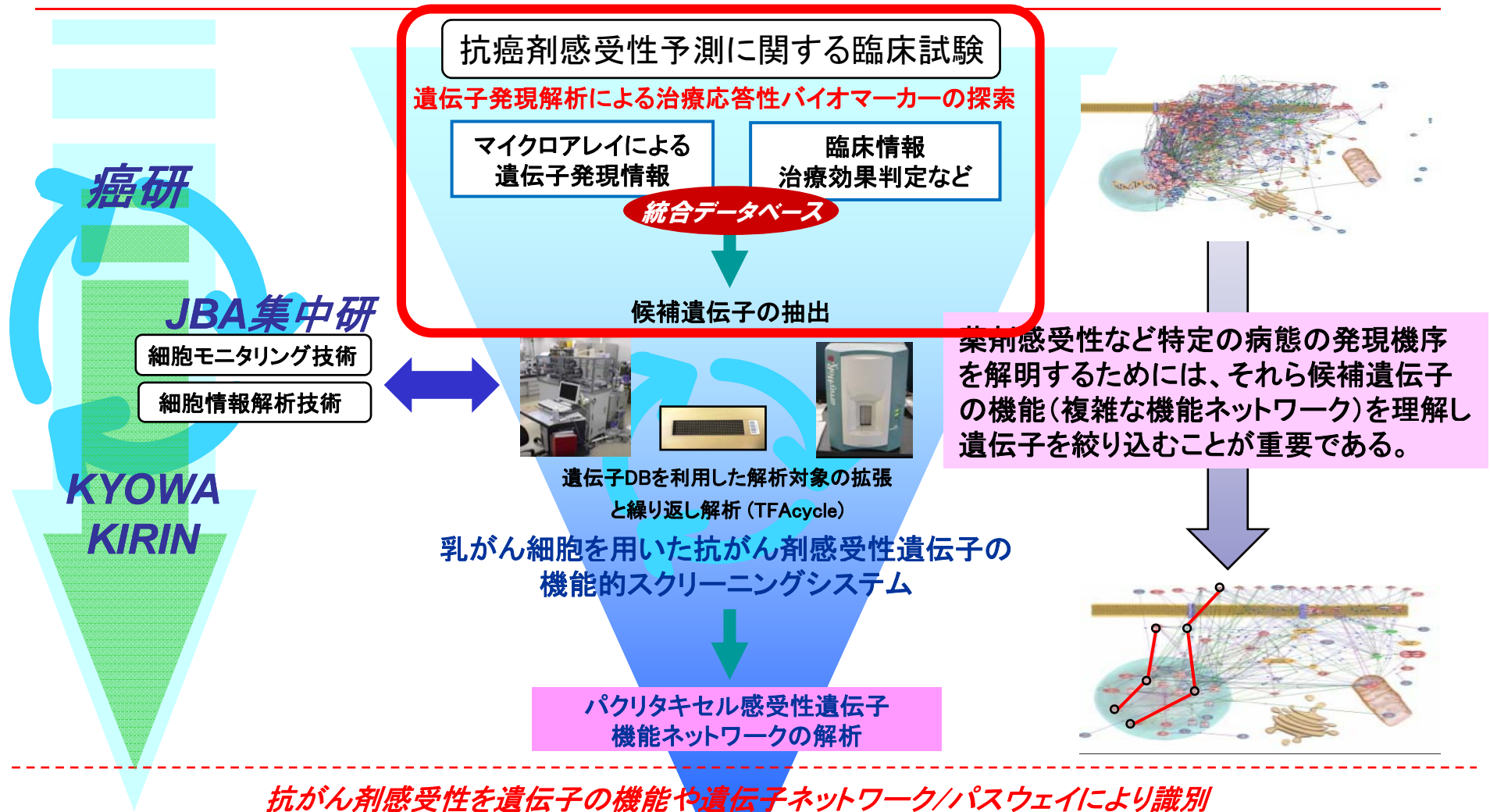
創薬ターゲット同定技術ケーススタディー (癌研究会、協和発酵キリン)

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

- ✓ パクリタキセル感受性候補遺伝子の同定
- ✓ パクリタキセル感受性診断の構築
- ✓ 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
- ✓ 乳がん培養細胞株の樹立とターゲット遺伝子の検証

創薬ターゲット同定技術ケーススタディー

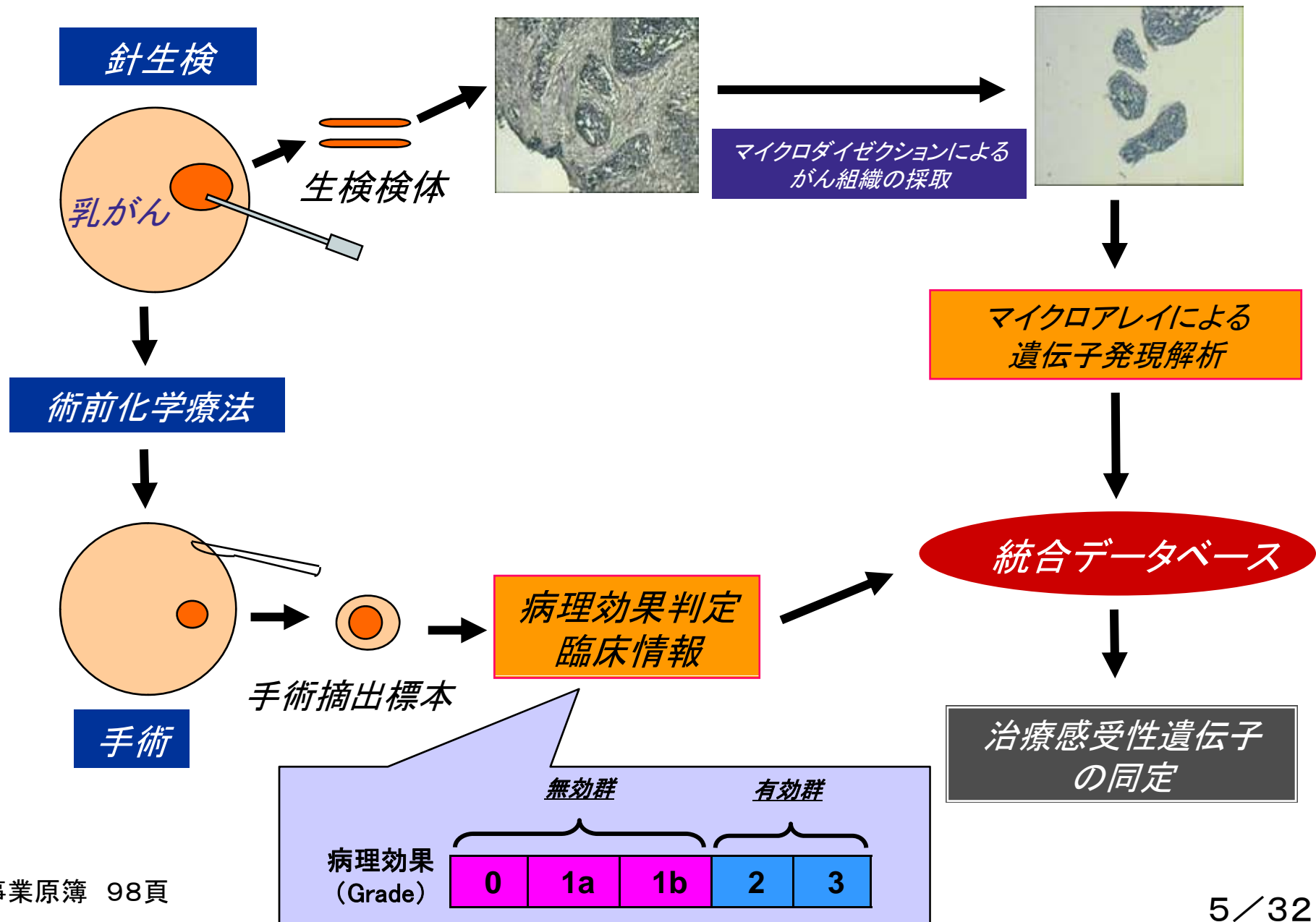
パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索



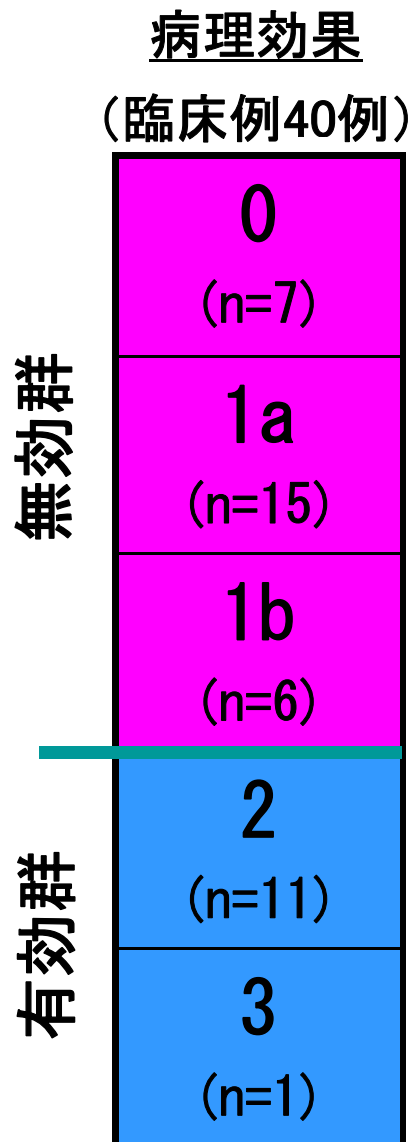
Output

乳がん術前抗がん剤感受性予測に関する臨床試験

公開



遺伝子発現プロファイルによる候補遺伝子の選定



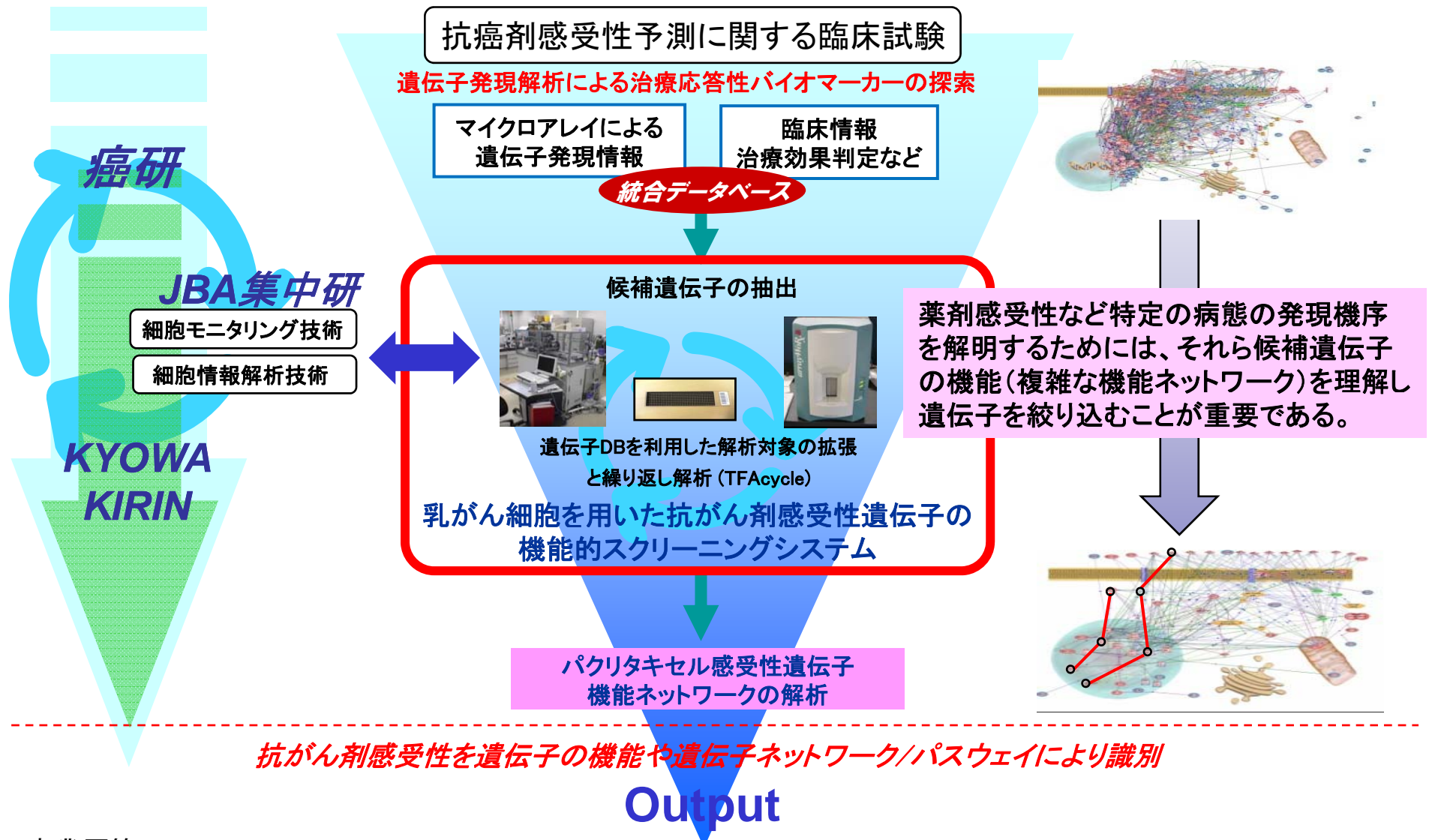
統計学的手法による遺伝子の選定

病理効果判定によるGrade 0~1b と Grade 2, 3 について、マイクロアレイの結果よりMann-Whitney U-test ($p < 0.05$)により2群間で発現差が認められる遺伝子 106個を選定。

$$H_0 : \mu_R = \mu_{NR}$$

$$H_A : \mu_R + 0.6 < \mu_{NR}, \quad H'_A : \mu_R > \mu_{NR} + 0.6$$

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



抗癌剤感受性遺伝子の機能解析によるスクリーニングシステム

公開

パクリタキセル感受性候補遺伝子の選定

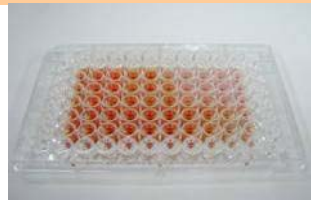
マイクロアレイによる遺伝子発現解析

↓
siRNAの設計・合成

チップ作製



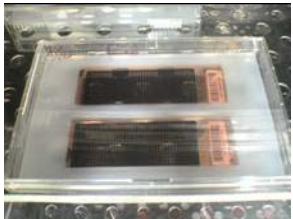
固相ウェルベースで検討



↓
siRNAの評価
実験系の評価

乳がん細胞播種

トランスフェクション



↓ 24h
↓ パクリタキセル添加 (0 - 20nM)
↓ 72 hr
↓ カルセイン染色
(細胞死をもとに評価)

蛍光強度測定

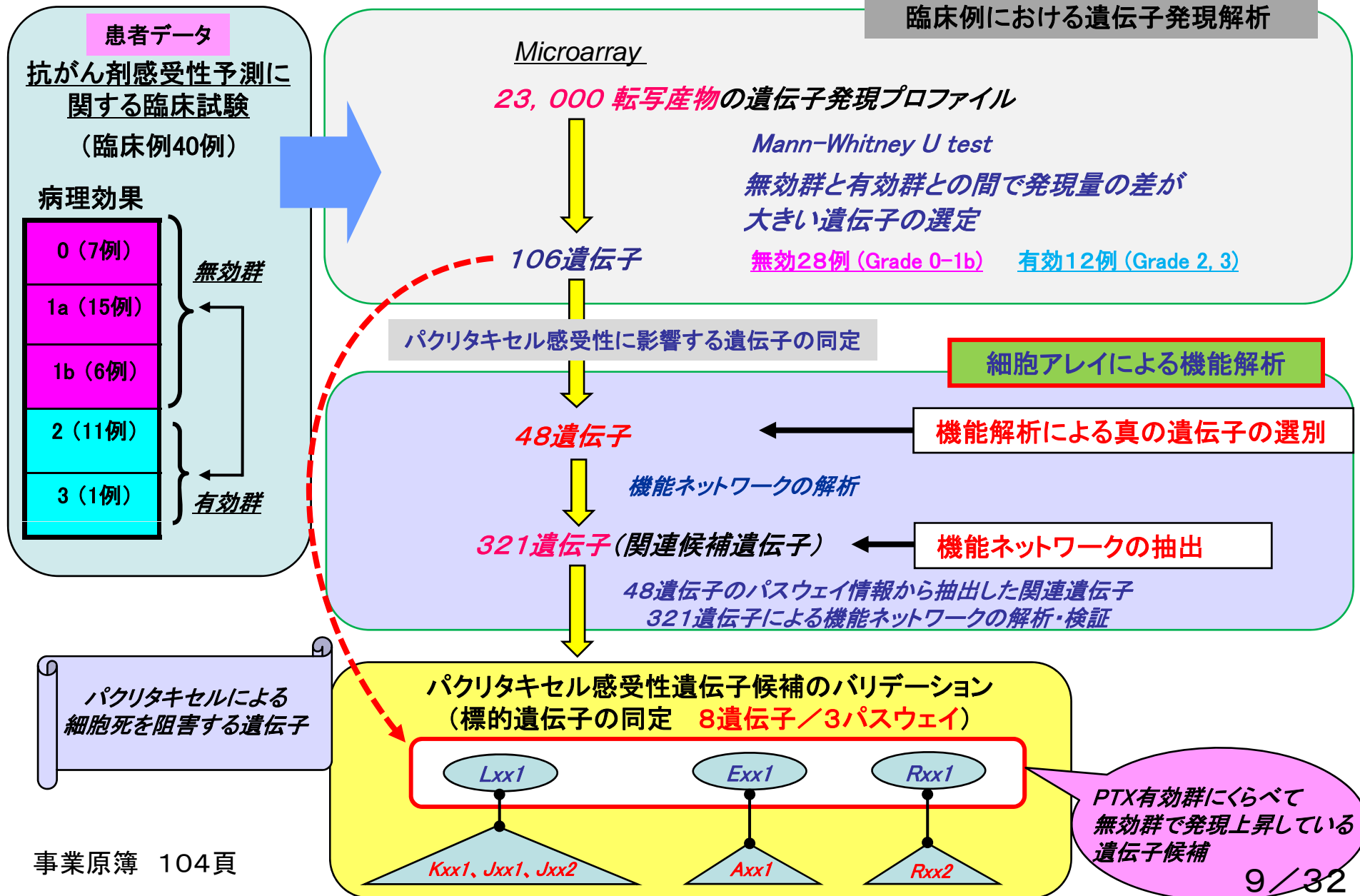


↓
数値化

Array WorX (Amersham)

機能解析による真の遺伝子の選別

パクリタキセル感受性候補遺伝子の同定



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

パクリタキセル (PTX) 感受性遺伝子群絞り込み

患者データ (臨床試験)
(PTX治療効果; 有効群 vs 無効群)

Microarray 解析 ⇒ 候補遺伝子群

パクリタキセル感受性遺伝子機能
ネットワークの解析

遺伝子DBを利用した解析対象の拡張
と繰り返し解析 (TFACycle)

Output

PTX感受性診断用途

PTX併用治療標的用途

PTX治療効果予測システムの構築

- ・ PTX治療症例での標的遺伝子の発現解析
- ・ PTX治療症例での効果予測

同定された8遺伝子 (3パスウェイ) の ウェルベースでの検証

- ・ 単独および複数のパスウェイ組み合わせによるPTX併用効果の検証

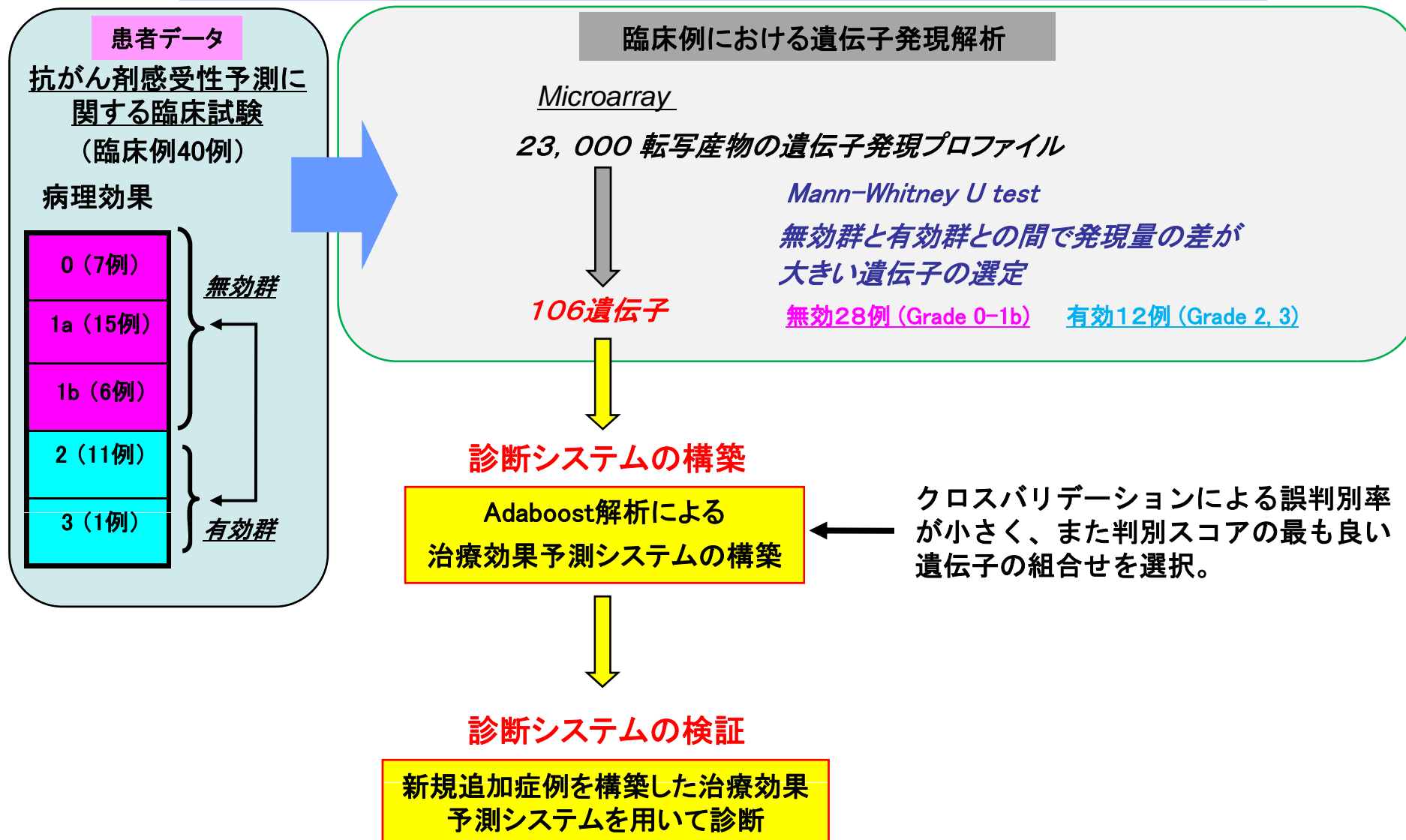
期待される効果

- より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立することで、患者に合わせた最も有効な抗癌剤の選択を可能にするだけでなく、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。
- 抗癌剤の薬効発現機序に関わる遺伝子およびネットワークは、新たな抗癌剤標的につながる。

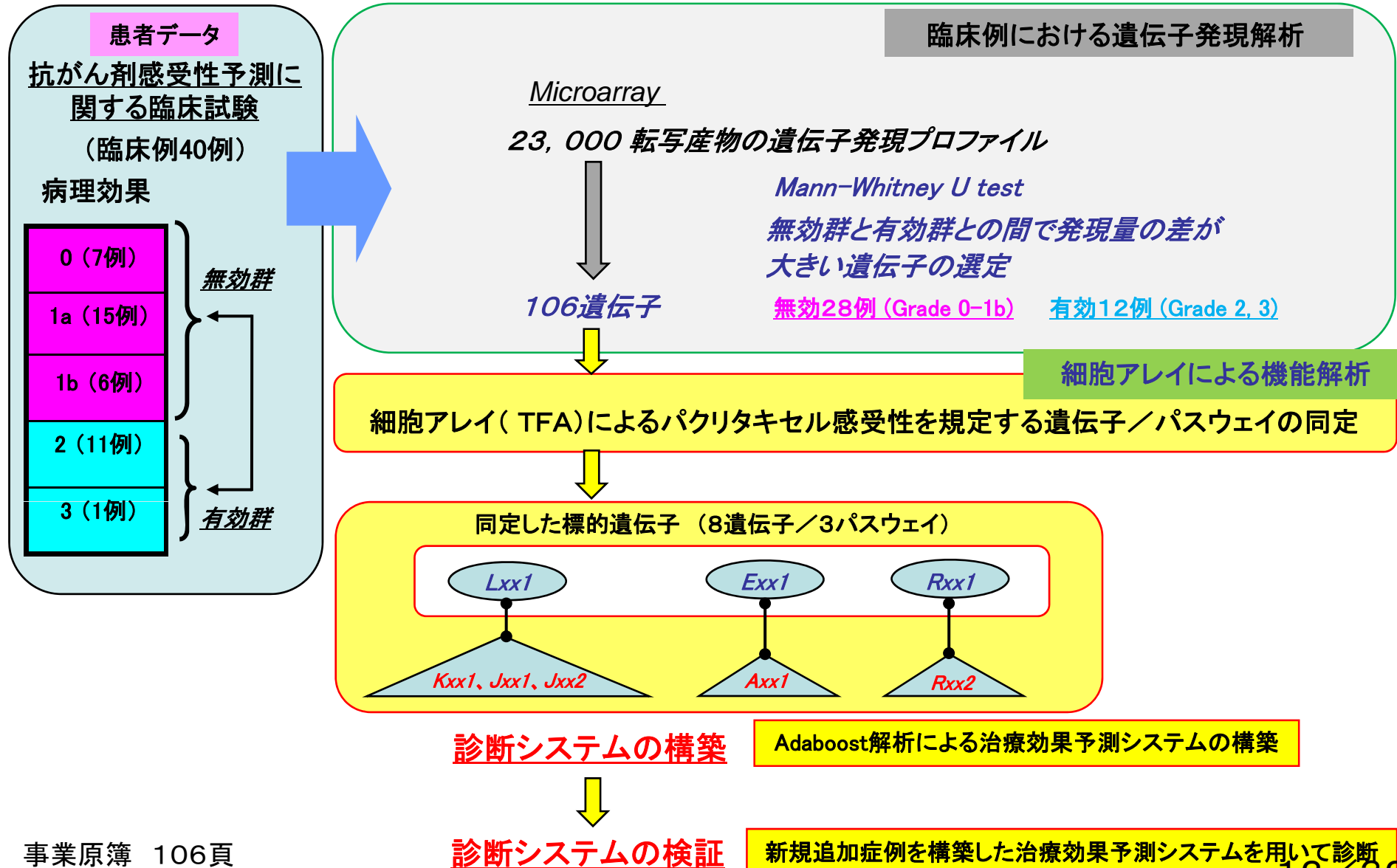
パクリタキセル感受性診断の構築と検証(1)

公開

遺伝子発現情報をもとに選定した遺伝子を用いた診断システム

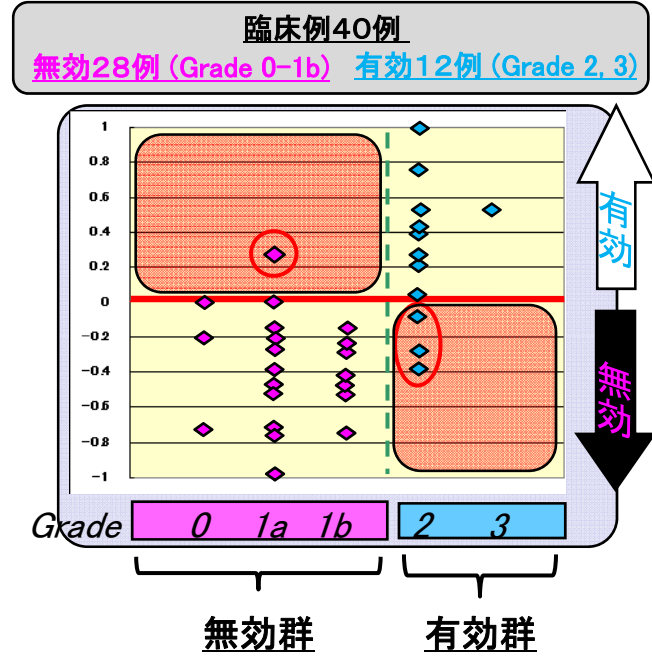


TFAによる遺伝子機能解析で同定した遺伝子を用いた診断システム

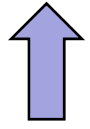


パクリタキセル感受性診断の構築と検証

治療効果予測システムの構築



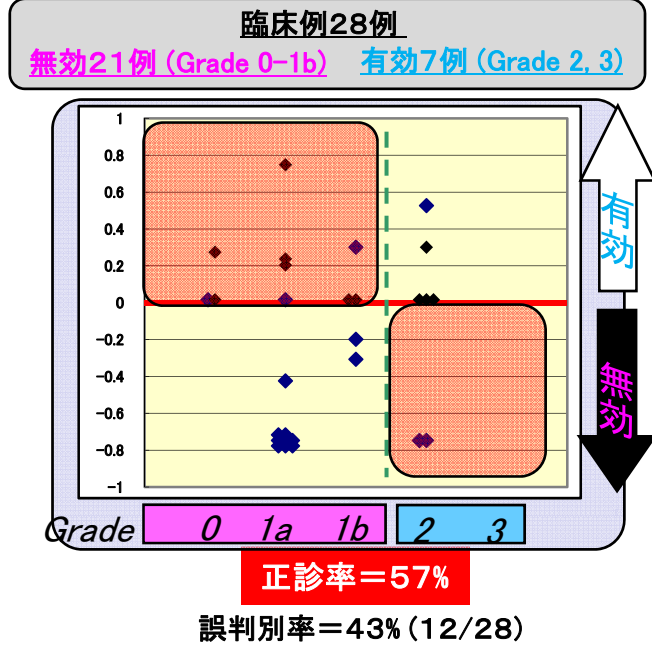
誤判別率 = 10% (4/40)
Leave-one-out cross validation



遺伝子発現解析から選定された106遺伝子をもとに
Adaboost解析による治療効果予測システムの構築

5遺伝子を用いたプロトタイプ診断
システムの正診率 : 90%

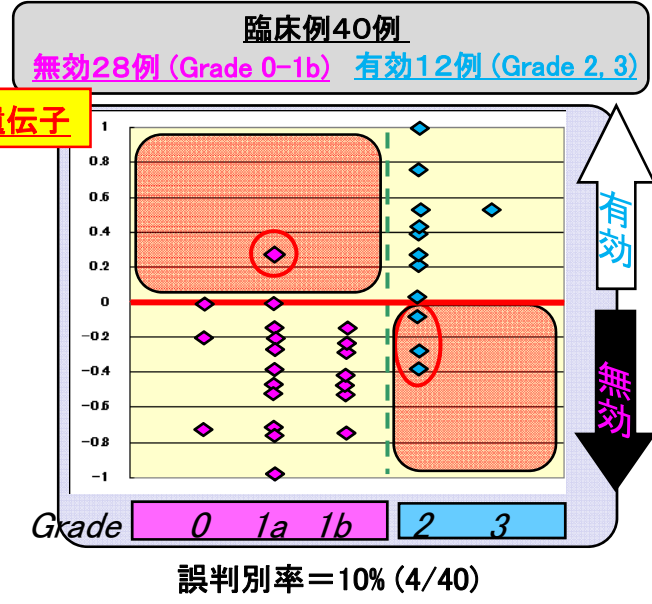
新規症例による検証



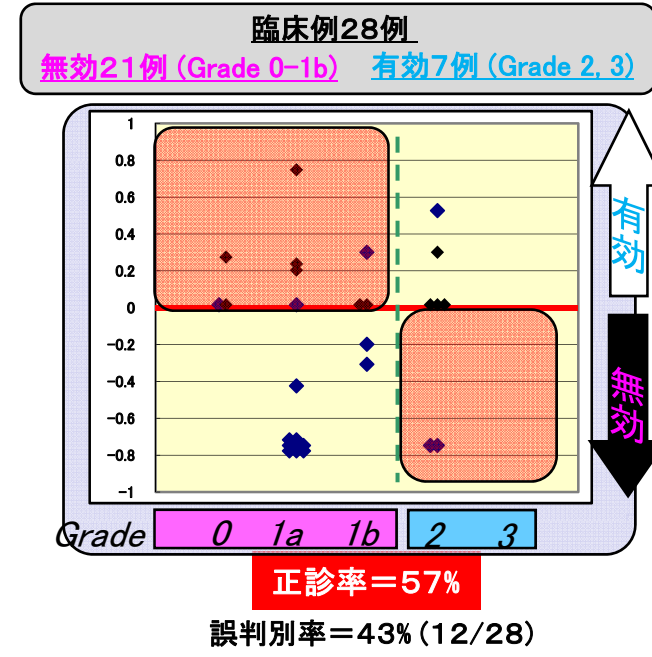
パクリタキセル感受性診断の構築と検証

公開

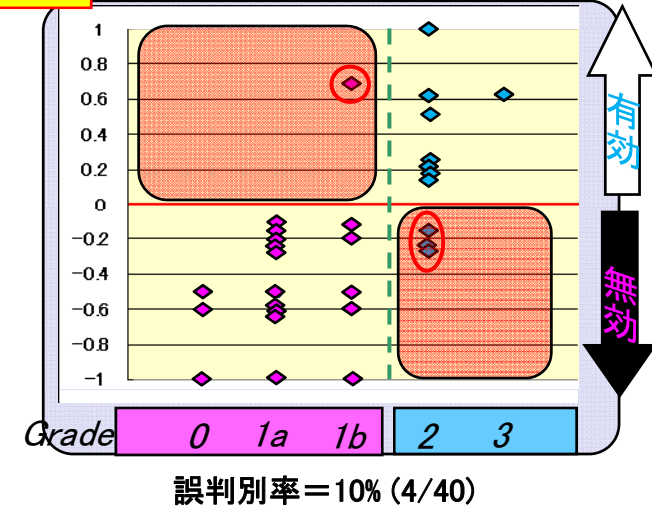
治療効果予測システムの構築



新規症例による検証



4遺伝子 機能ネットワーク解析で新たに選定された3遺伝子を含む



細胞アレイ(TFA)による遺伝子機能解析で同定した8遺伝子をもとにAdaboost解析による治療効果予測システムの構築

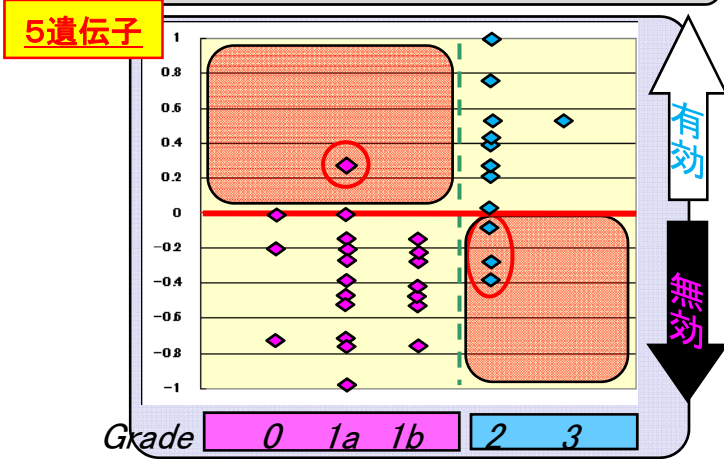
4遺伝子を用いたプロトタイプ診断システムの正診率 : 90%

パクリタキセル感受性診断の構築と検証

公開

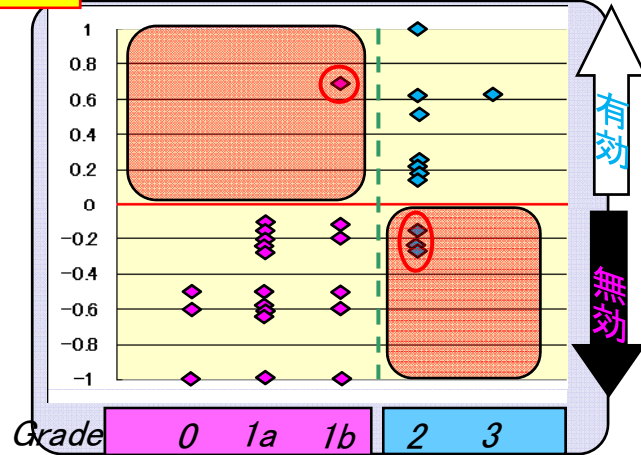
治療効果予測システムの構築

臨床例40例
無効28例 (Grade 0-1b) 有効12例 (Grade 2, 3)



誤判別率 = 10% (4/40)

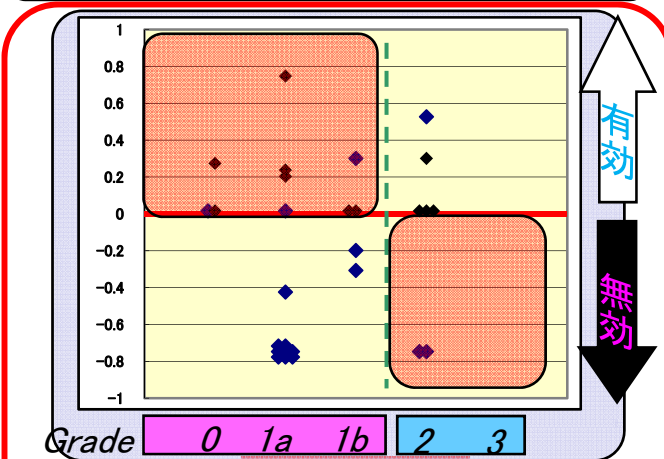
4遺伝子 機能ネットワーク解析で新たに選定された3遺伝子を含む



誤判別率 = 10% (4/40)

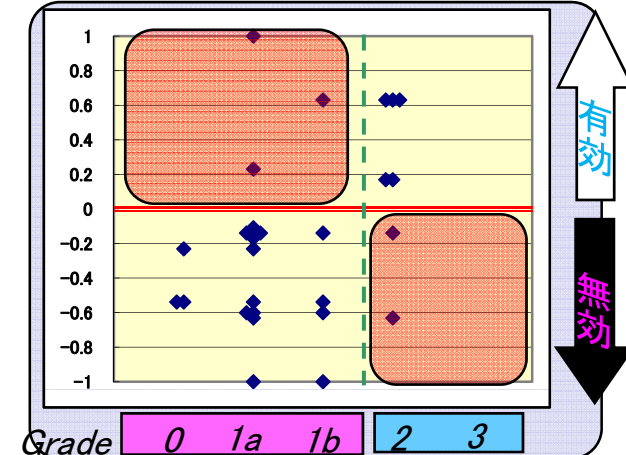
新規症例による検証

臨床例28例
無効21例 (Grade 0-1b) 有効7例 (Grade 2, 3)



正診率 = 57%

誤判別率 = 43% (12/28)



正診率 = 82%

誤判別率 = 18% (5/28)

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

パクリタキセル (PTX) 感受性遺伝子群絞り込み

患者データ (臨床試験)

(PTX治療効果; 有効群 vs 無効群)

Microarray 解析 ⇒ 候補遺伝子群

パクリタキセル感受性遺伝子機能
ネットワークの解析

癌研

JBA集中研

細胞モニタリング技術

細胞情報解析技術

遺伝子DBを利用した解析対象の拡張
と繰り返し解析 (TFAcycle)

KYOWA
KIRIN

PTX感受性診断用途

Output

PTX併用治療標的用途

PTX治療効果予測システムの構築

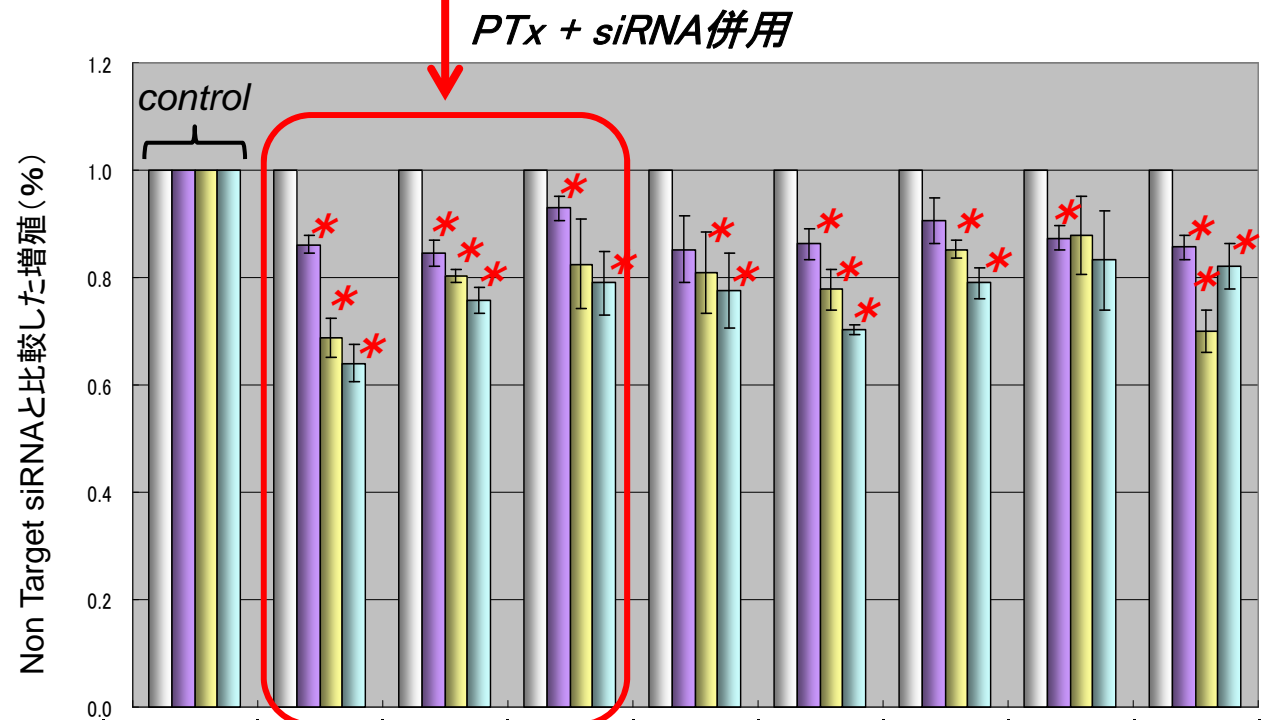
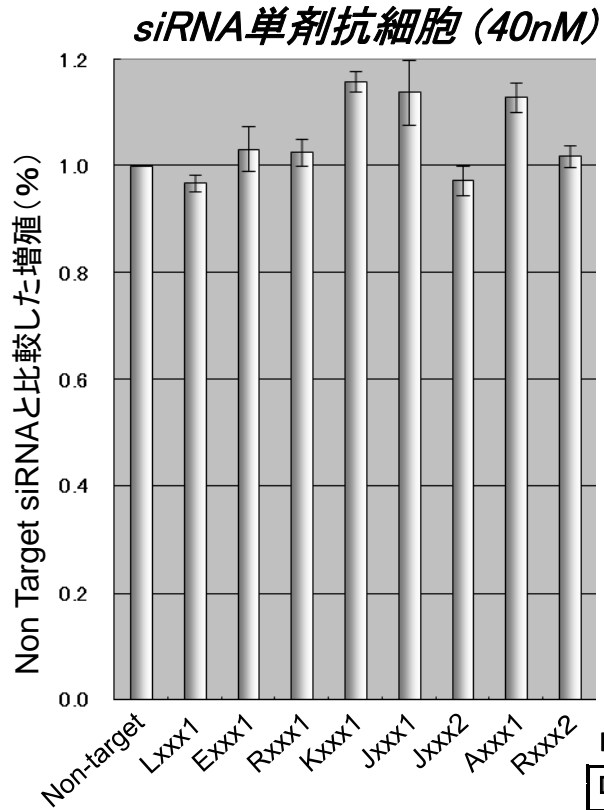
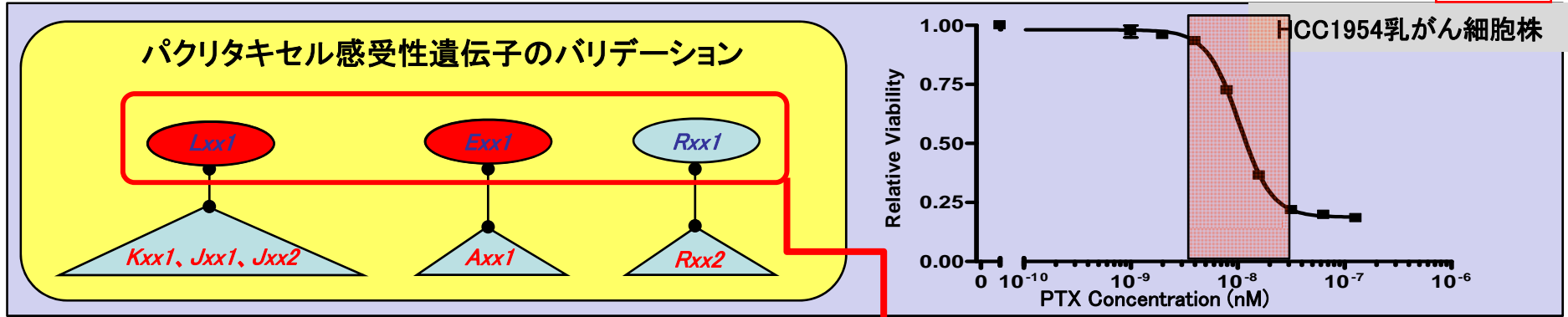
- ・ PTX治療症例での標的遺伝子の発現解析
- ・ PTX治療症例での効果予測

同定された8遺伝子 (3パスウェイ) の ウェルベースでの検証

- ・ 単独および複数のパスウェイ組み合わせによるPTX併用効果の検証

期待される効果

- ・ より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立することで、患者に合わせた最も有効な抗癌剤の選択を可能にするだけでなく、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。
- ・ 抗癌剤の薬効発現機序に関わる遺伝子およびネットワークは、新たな抗癌剤標的につながる。



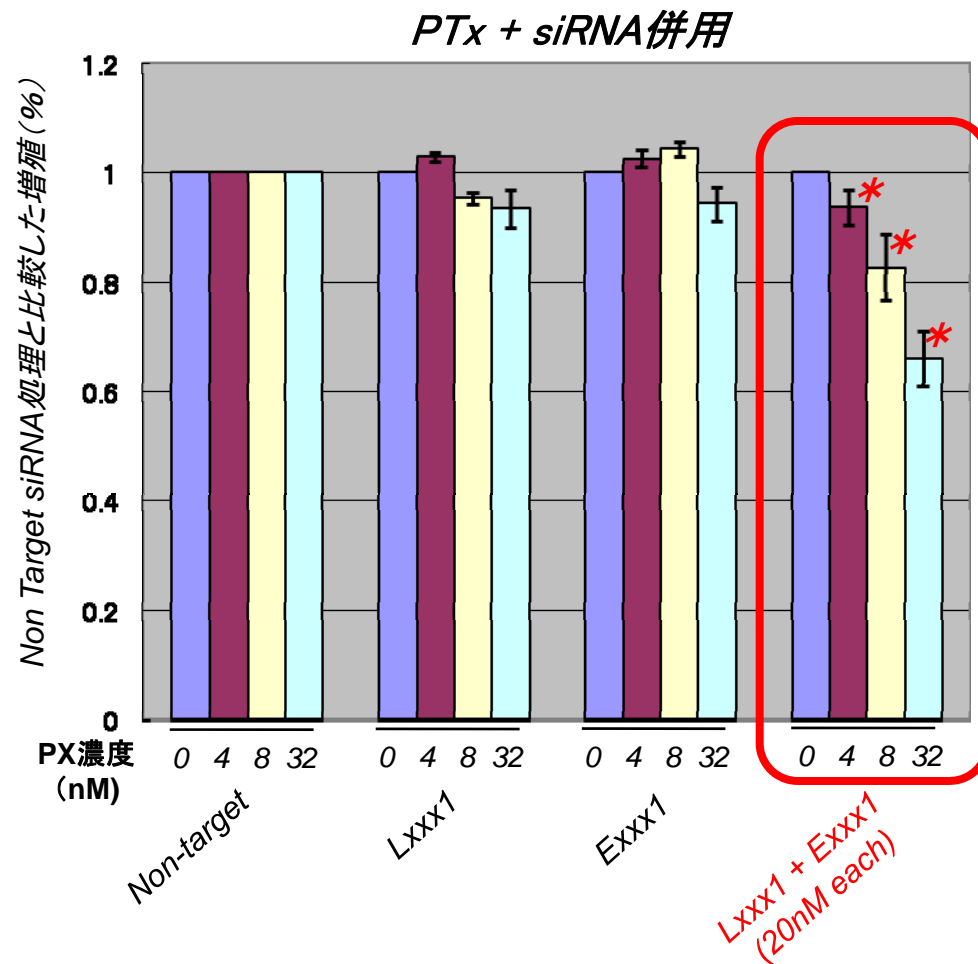
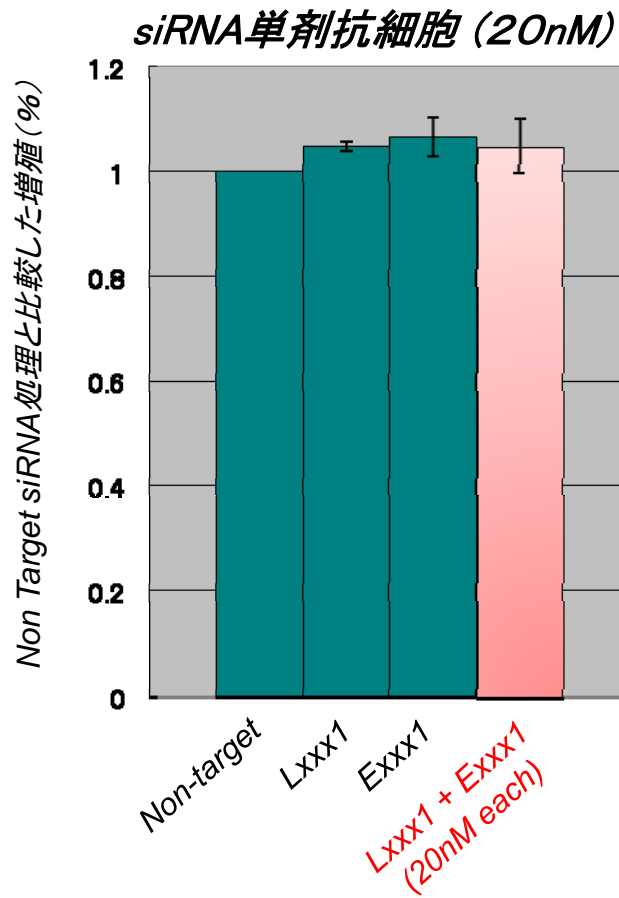
PTX濃度	Non-target	Lxxx1	Exxx1	Rxxx1	Kxxx1	Jxxx2	Jxxx1	Axxx1	Rxxx2
0nM	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
4nM	1.000	0.861	0.846	0.929	0.852	0.862	0.907	0.874	0.857
8nM	1.000	0.688	0.803	0.824	0.810	0.778	0.853	0.879	0.700
32nM	1.000	0.640	0.758	0.790	0.777	0.702	0.791	0.833	0.821

* P < 0.05

公開

複数パスウェイの組み合わせ阻害による パクリタキセル併用治療標的としての評価

— HCC1954乳がん細胞株 —



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

パクリタキセル(PTX)感受性遺伝子群絞り込み

患者データ(臨床試験)

(PTX治療効果; 感受性 vs 非感受性)

Microarray 解析 ⇒ 候補遺伝子群

パクリタキセル感受性遺伝子機能
ネットワークの解析

遺伝子DBを利用した解析対象の拡張
と繰り返し解析(TFAcycle)

Output

乳癌培養細胞株
& primary culture
の樹立

癌研

JBA集中研

細胞モニタリング技術

細胞情報解析技術

KYOWA
KIRIN

PTX感受性診断用途

PTX併用治療標的用途

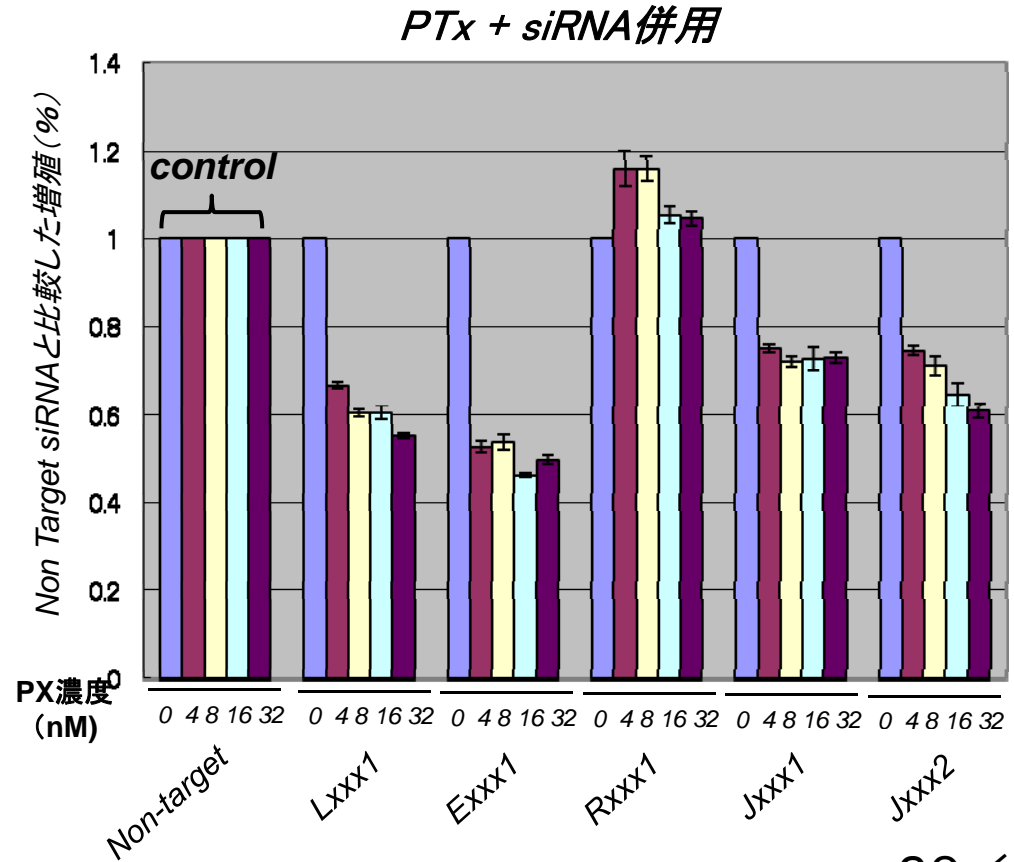
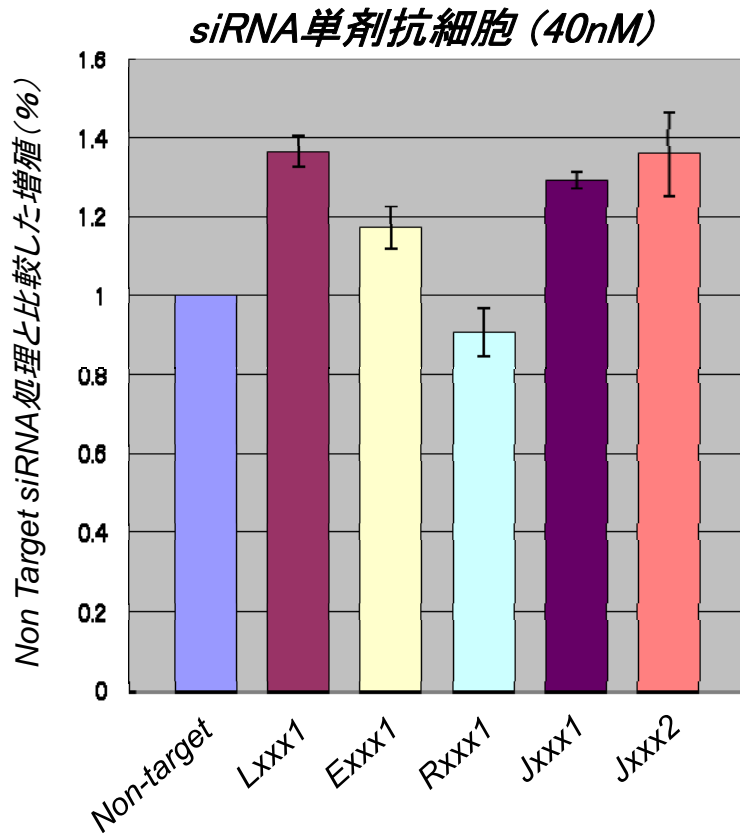
乳がん培養細胞株樹立

- 針生検検体 10~20の初代培養細胞株が常時培養
- 手術摘出検体 9株の培養細胞株樹立
・乳腺葉状腫瘍 2株、Triple-negative 1株を含む

乳がん培養細胞株の樹立とターゲット遺伝子の検証

～パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証～

—乳がん細胞株HBC11(トリプルネガティブ乳がん)—



成果のまとめ

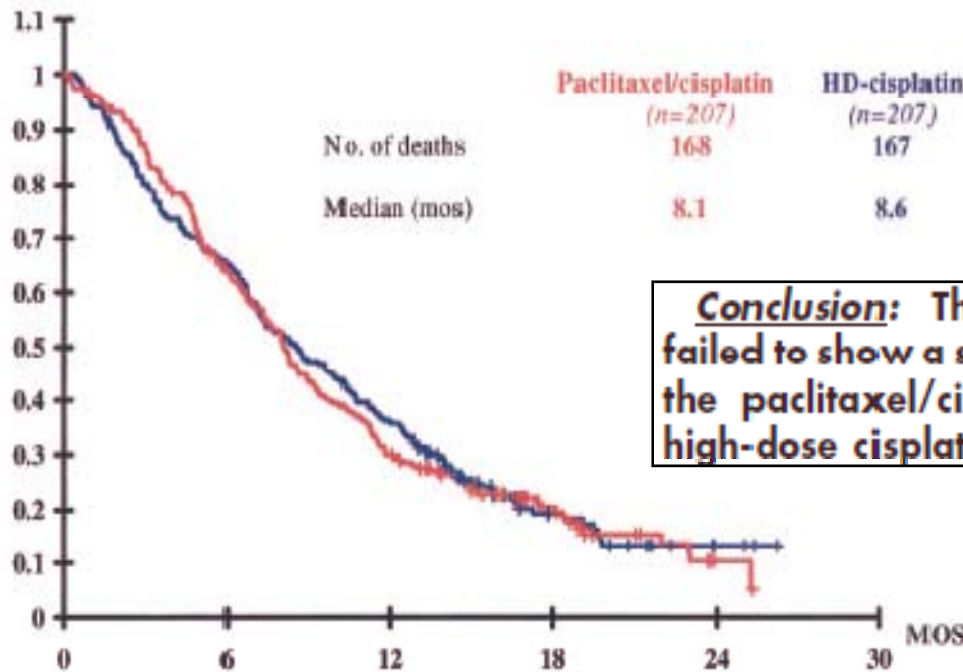
- パクリタクセル感受性、非感受性乳がん患者組織の遺伝子発現情報をもとに、細胞アレイ(TFA)を用いた遺伝子機能ネットワーク解析により、パクリタクセルによる細胞死を阻害する遺伝子(3パスウェイ)を同定した。
- 同定したパクリタクセル感受性規定遺伝子を用いて、高精度な治療効果予測システムを構築した。
- siRNAによるパクリタクセル感受性規定遺伝子の発現阻害は、パクリタキセルによる細胞死の促進を示した。
- 複数のパスウェイの同時阻害は、単独阻害に比べパクリタキセルによる細胞死の効果増強を示した。

パスウェイ解析を利用した 抗がん剤感受性遺伝子の同定

～抗癌剤創薬から見た本プロジェクトの位置付け～

20世紀の抗がん剤併用療法開発の一例

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



JCO, Vol.18, p3390, 2000
からの引用

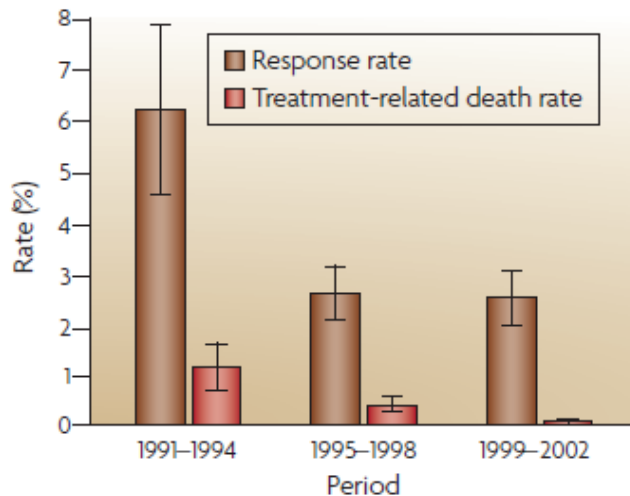
Conclusion: This large randomized phase III trial failed to show a significant improvement in survival for the paclitaxel/cisplatin combination compared with high-dose cisplatin in patients with advanced NSCLC.

Fig 1. Survival.

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？

分子標的療法の理想と現実

【分子標的療法】 がん細胞で特異的に発現・活性化している標的分子を阻害して特異的に死滅させる薬剤（抗体、キナーゼ阻害剤）など



	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	代謝拮抗
	Capecitabine	代謝拮抗
	Oxaliplatin	白金製剤
乳癌	Docetaxel, Paclitaxel	微小管作用
	Doxorubicin, Epirubicine	DNA作用
	Cyclophosphamide	DNA作用
	Fulvorouracil	代謝拮抗
	Gemcitabine	代謝拮抗
	Capecitabine	代謝拮抗
	Vinorelbine	微小管作用
非小細胞肺癌	Cisplatin, Carboplatin	白金製剤
	Vinorelbine	微小管作用
	Etoposide	トポイソメラーゼ
	Docetaxel, Paclitaxel	微小管作用
	Gemcitabine	代謝拮抗
	Vinblastine	微小管作用
	Pemetrexed	代謝拮抗
	Irinotecan	トポイソメラーゼ
	Ifosfamide	DNA作用
	Mitomycin	DNA作用
		Bevacizumab VEGF
		Cetuximab EGFR
		Panitumumab EGFR
		Trastuzumab Her2
		Lapatinib Her2
		Bevacizumab VEGF
		Cetuximab EGFR
		Erlotinib EGFR

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

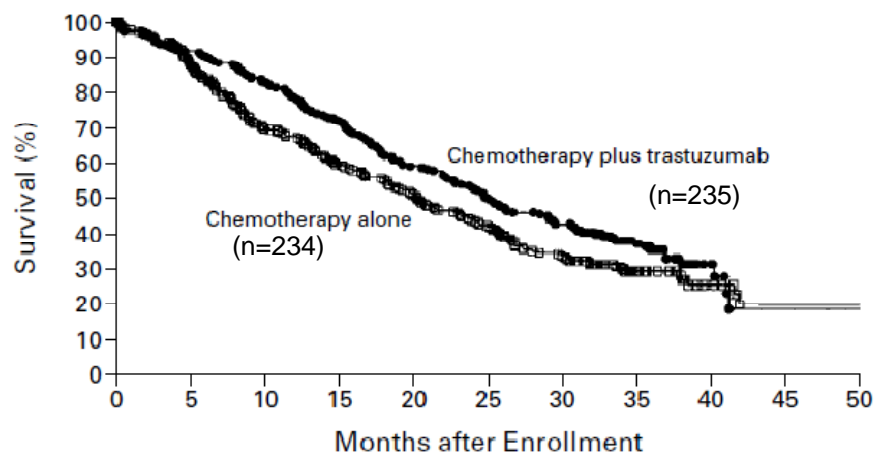
NCCNガイドラインより抜粋
2010年2月

- ✓ 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ている
(=既存抗癌剤は引き続き使われ続ける)

分子標的療法の時代も併用療法のサイエンスは未成熟

Her2抗体 (Trastuzumab)

乳癌 化学療法との併用PIII試験の事例



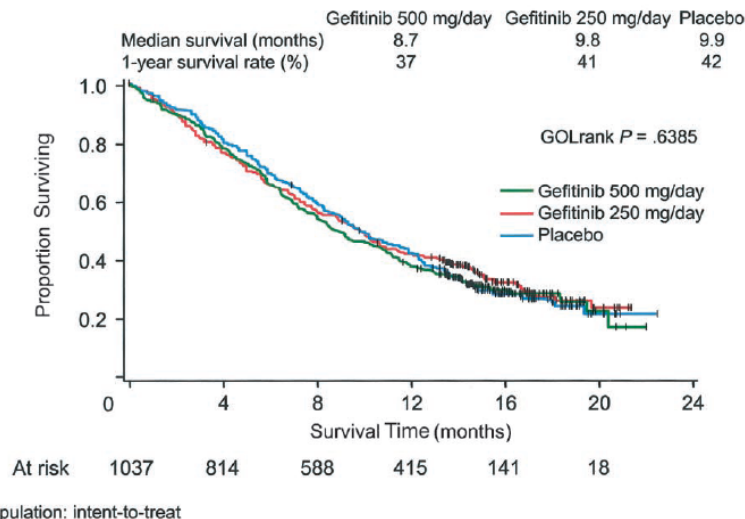
N Engl J Med, Vol. 344, No. 11 · March 15, 2001

化学療法に対するHer2抗体併用のベネフィットあり。

- ・ 病勢進行までの中央値 (4.6 mo vs 7.4 mo)
- ・ 奏効率 (32% vs 50%)
- ・ 生存期間 (20.3 mo vs 25.1 mo)

EGFR阻害剤 (Gefitinib)

肺癌 化学療法 (パクリタクセル+カルボプラチン) との併用PIII試験の事例

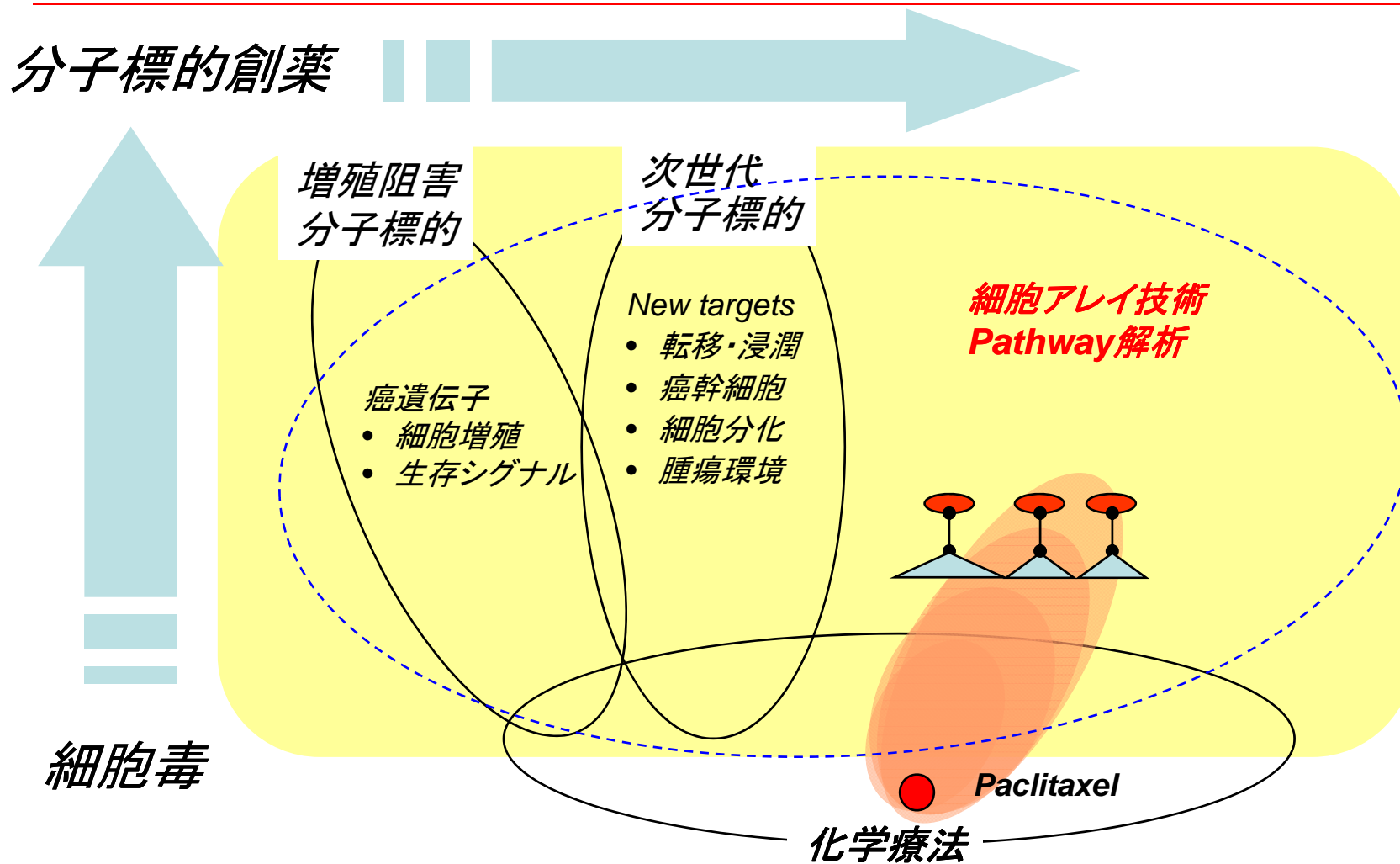


J Clin Oncol 22:785-794. © 2004 by American Society of Clinical Oncology

化学療法に対するEGFR阻害剤併用のベネフィットを臨床試験 (1073患者エントリー) で示せなかった。

既存薬併用のサイエンスの道を切り開くことが、
抗癌剤創薬の新たなツールになる

抗癌剤創薬から見たプロジェクトの位置付け



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

併用療法創薬の現状と本研究の到達点

【抗癌剤併用療法の創薬における課題】

- 併用薬の最適な組み合わせのサイエンスは未成熟。
- 薬剤に応答して細胞の中で起こ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）との繋がりを理解する技術や方法論が必要。

【本研究での到達点】

遺伝子機能ネットワーク解析（細胞増殖を指標）により、薬剤感受性予測、併用標的に関与するパスウェイを絞り込むことができることを示した。

今後の応用可能性

遺伝子機能ネットワーク解析(細胞増殖を指標)による
併用薬感受性因子パスウェイの絞込み技術

より高度な薬剤細胞応答の理解

動的ネットワーク解析
シュミレーション技術

細胞時系列解析技術

細胞機能解析技術の多様化
(細胞増殖、浸潤、遊走機能など)

薬剤に応答する細胞内の動的なパスウェイからの
効果予測・既存薬の効果を増強する併用分子標的薬

日本発の新たな創薬アプローチ

Appendices

本プロジェクトの位置付け;世界の動向

➤ 分子標的薬の感受性・非感受性バイオマーカー

Greevec ; BcrAbl耐性変異

Iressa、Tarceva ; EGFR感受性変異(野生型EGFR患者には効きにくい)

Cetuximab ; K-ras(下流因子)活性化患者は非感受性

臨床試験から見つかった単剤の効果予測マーカー

➤ マイクロアレイ解析による治療感受性や予後予測

ホルモン療法後の化学療法(アジュバンド)実施の遺伝子診断 (MammaPrintなど)

遺伝子発現パターンによる分子標的薬の感受性予測 (Dasatinib感受性など)

患者や感受性、非感受性細胞株の遺伝子を網羅的に解析して効果予測



➤ siRNAライブラリースクリーニングによる cytotoxic drug の感受性、非感受性因子探索

絨毯爆撃的なアプローチで網羅的に感受性・非感受性因子を探索

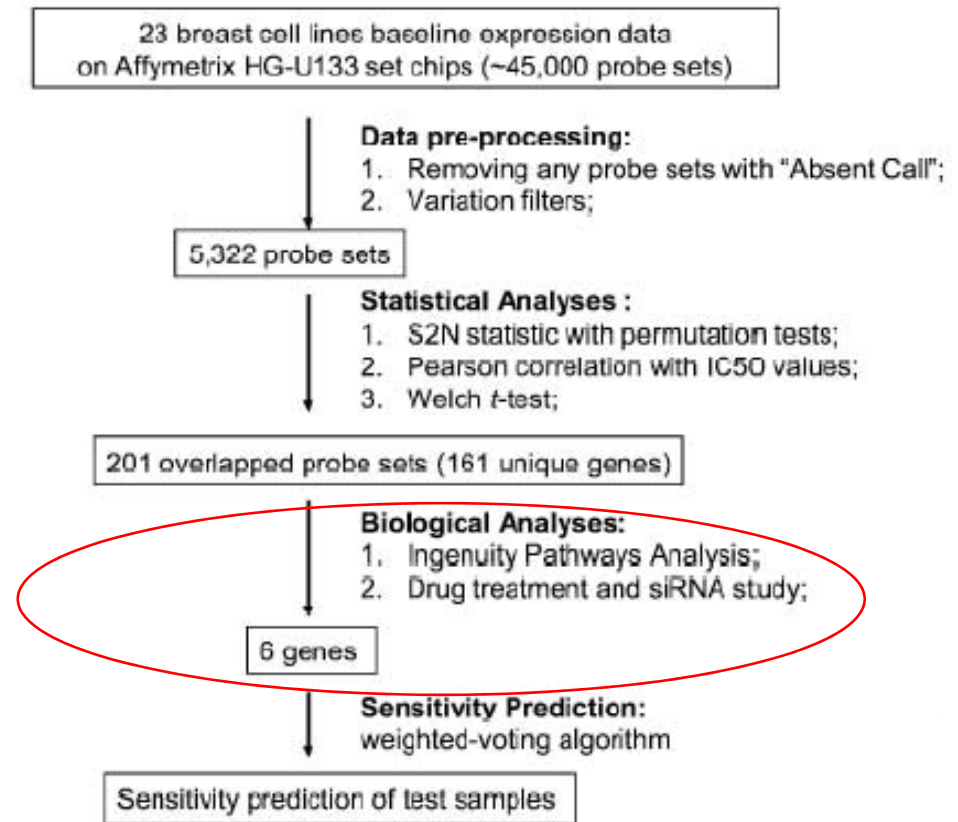
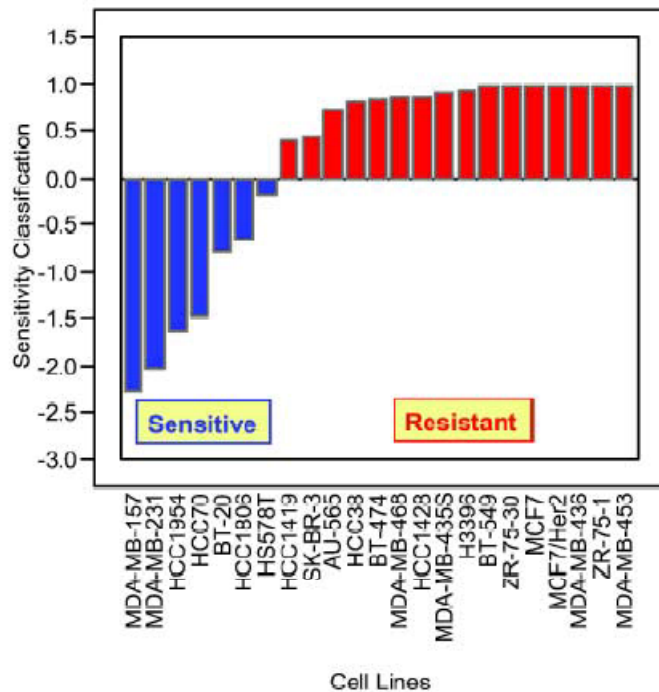


- ✓ 臨床試験で見つかった単剤に対する薬剤耐性の変異、あるいは網羅的な発現解析で感受性因子を見つけようとするアプローチが主流
- ✓ 既存抗癌剤を作用させてときの遺伝子の動きや、機能的(動的)繋がりは意識していない。
- ✓ 併用薬の選択を目的としたものではない。

世界の動向 ① ; マルチキナーゼ阻害剤 Dasatinib の感受性予測因子探索

Cancer Res 2007; 67: (5). March 1, 2007

Identification of Candidate Molecular Markers Predicting Sensitivity in Solid Tumors to Dasatinib: Rationale for Patient Selection



セルライン感受性データから候補遺伝子を抽出 (161遺伝子)

⇒ 6遺伝子に絞り込み161遺伝子を使った場合と同等の予測性があることをセルラインで検証

世界の動向 ② ; siRNAライブラリースクリーニングによる抗癌剤感受性因子探索

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

N ENGL J MED 357:3 WWW.NEJM.ORG JULY 19, 2007

CLINICAL IMPLICATIONS OF BASIC RESEARCH

Rational Design of Cancer-Drug Combinations

Sridhar Ramaswamy, M.D.

Cancer Cell Vol.446, p815, 2007

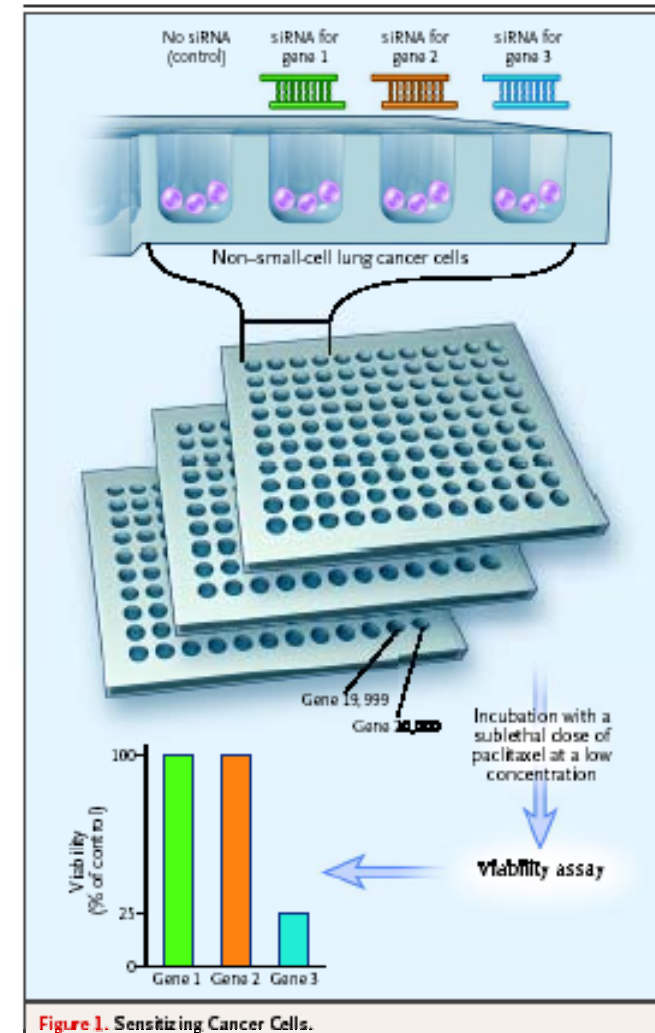
Regulators of Mitotic Arrest and Ceramide Metabolism Are Determinants of Sensitivity to Paclitaxel and Other Chemotherapeutic Drugs

Charles Swanton,^{1,7} Michela Marani,^{1,7} Olivier Pardo,¹ Patricia H. Wame,¹ Gavin Kelly,² Erik Sahai,³ Frédéric Elustondo,⁴ Jenny Chang,⁵ Jillian Temple,⁶ Ahmed A. Ahmed,⁶ James D. Brenton,⁶ Julian Downward,^{1,*} and Barbara Nicke¹

siRNAライブラリーを用いてpaclitaxel 感受性を高める
標的を絨毯爆撃的なアプローチでスクリーニング



COL4A3BP、CERT (ceramide transport protein)



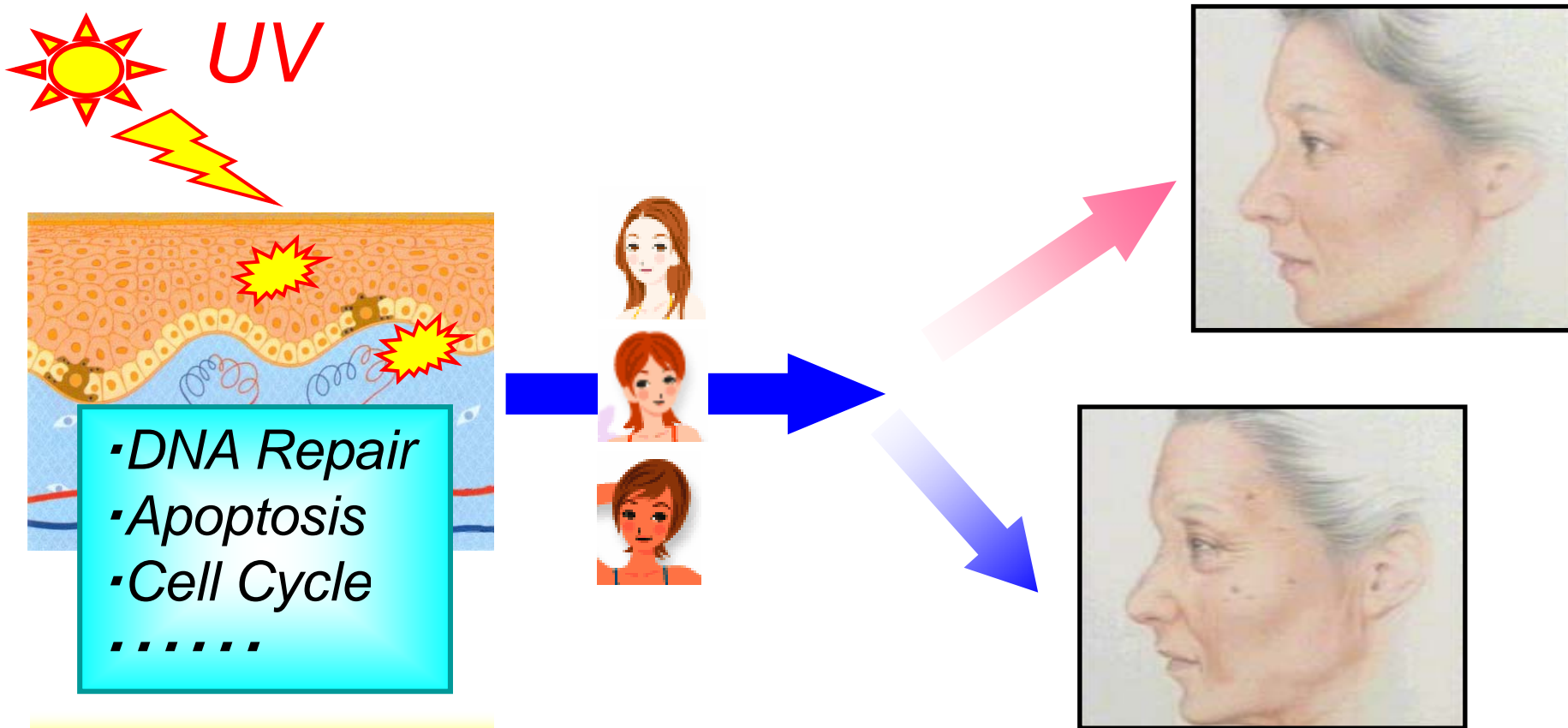
応用研究

- ・ 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)
- ・ 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)

パスイエイ解析を応用した 機能性化粧品の開発

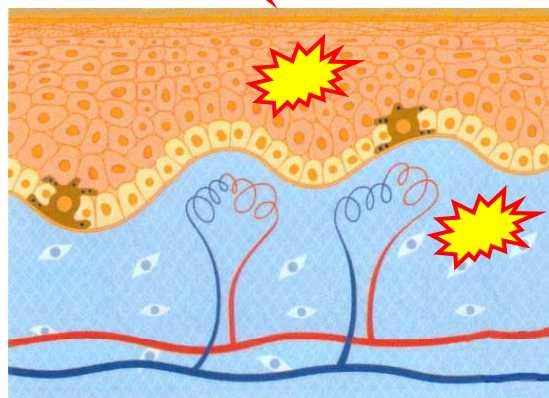
- ✓ 紫外線感受性遺伝子のターゲッティングと化粧品産業への応用
- ✓ 紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張

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



紫外線応答パスウェイ

紫外線は皮膚老化を加速させる最大の環境要因



化粧品開発を通じ
将来の美を提供



光老化
シミ・シワ

皮膚ガン
日光角化症(前癌症)

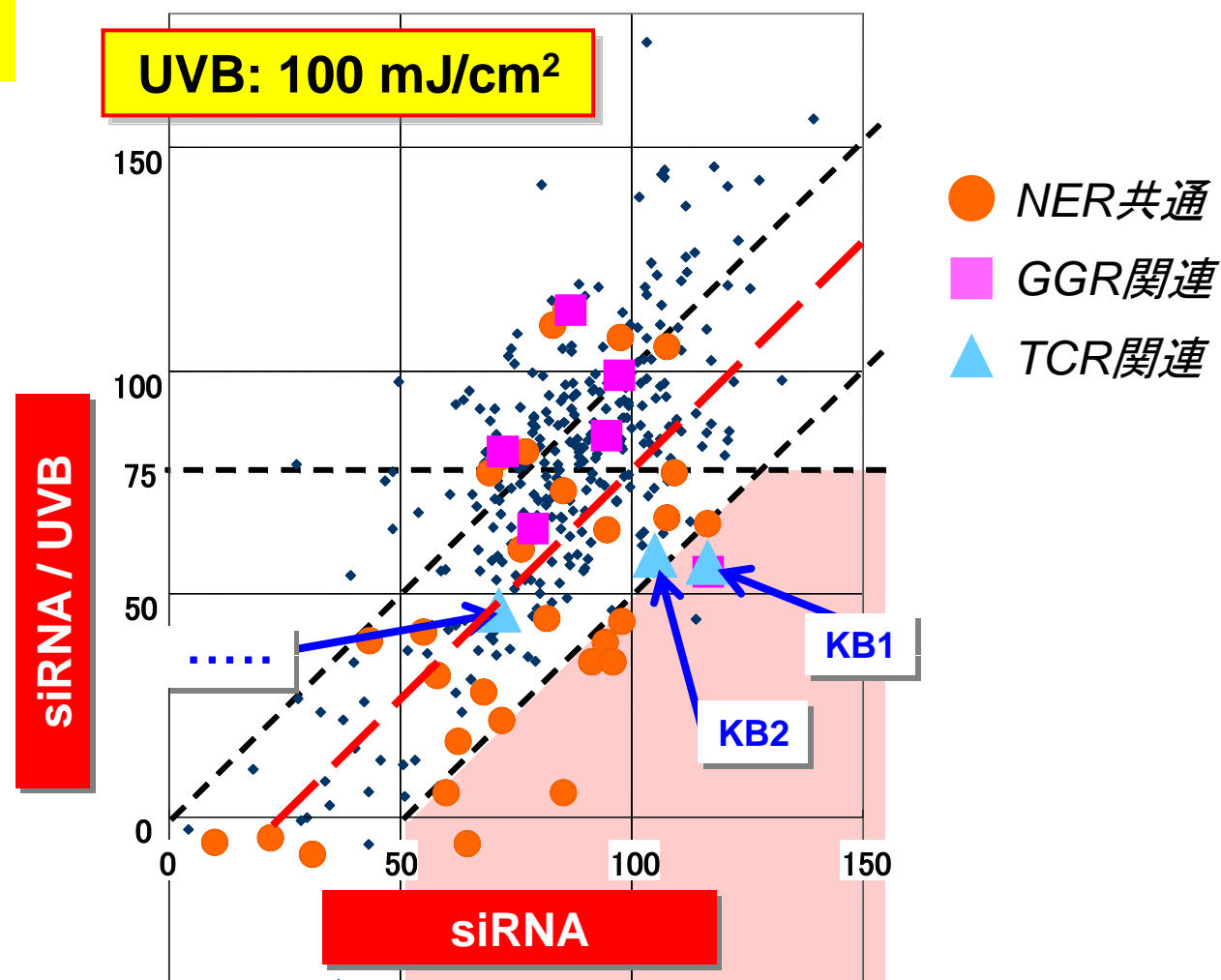
病態悪化
光線過敏症・アトピー

Age



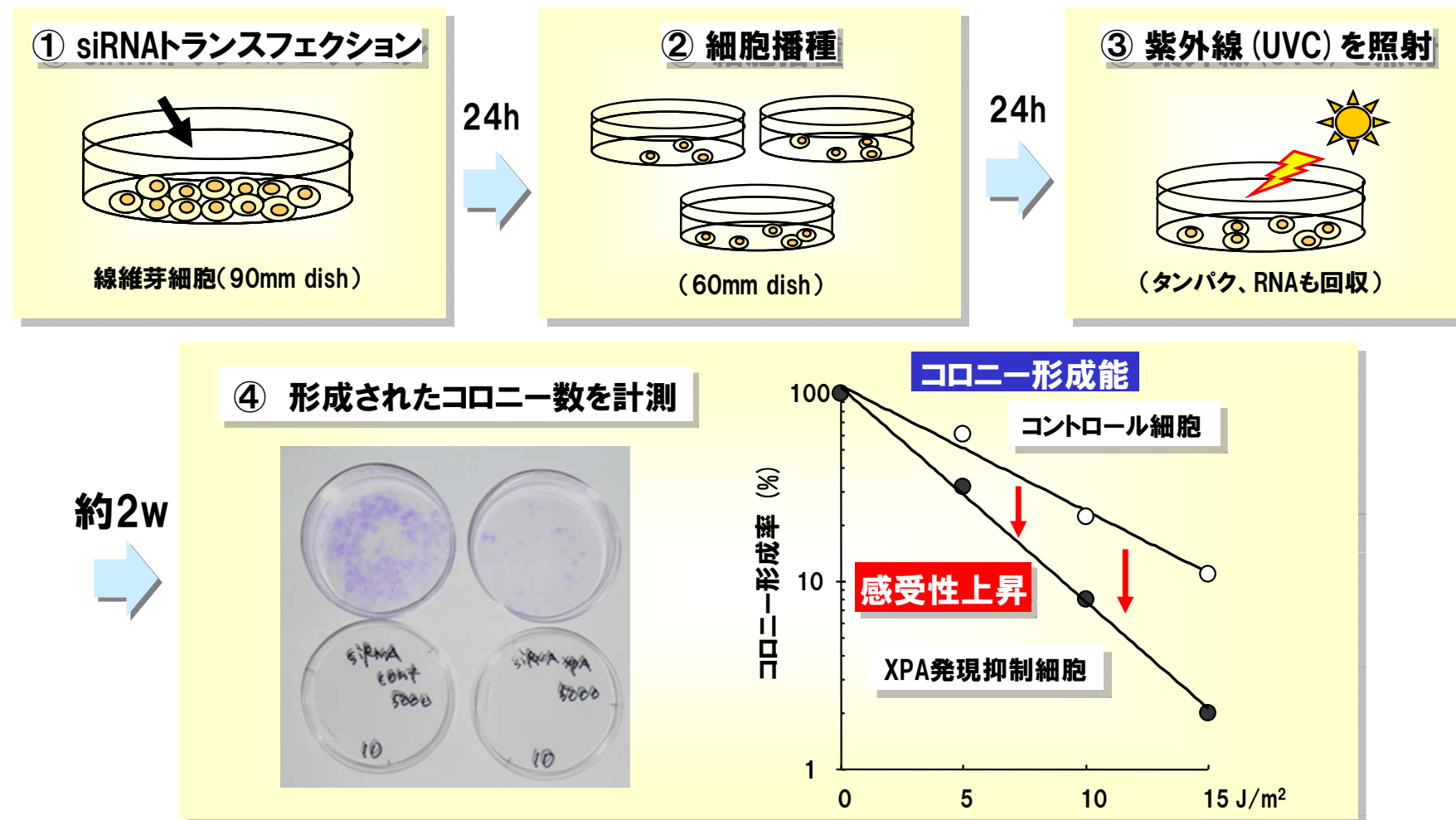
Nucleotide Excision Repair パスウェイに着目した解析

TFA解析結果



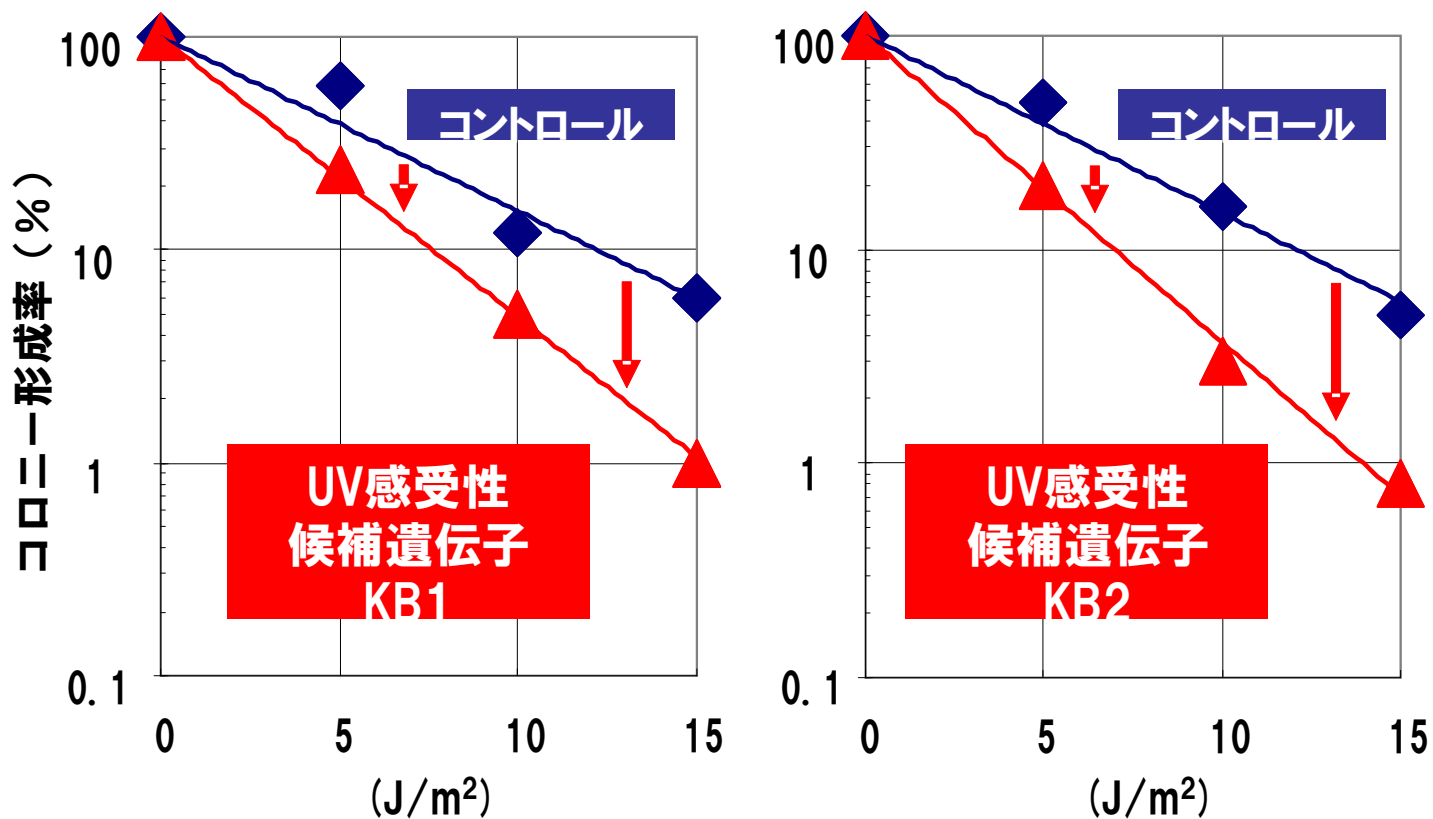
TCRに特異的な反応に関わる遺伝子の発現低下により
紫外線感受性が高まる傾向がある

紫外線感受性の検証



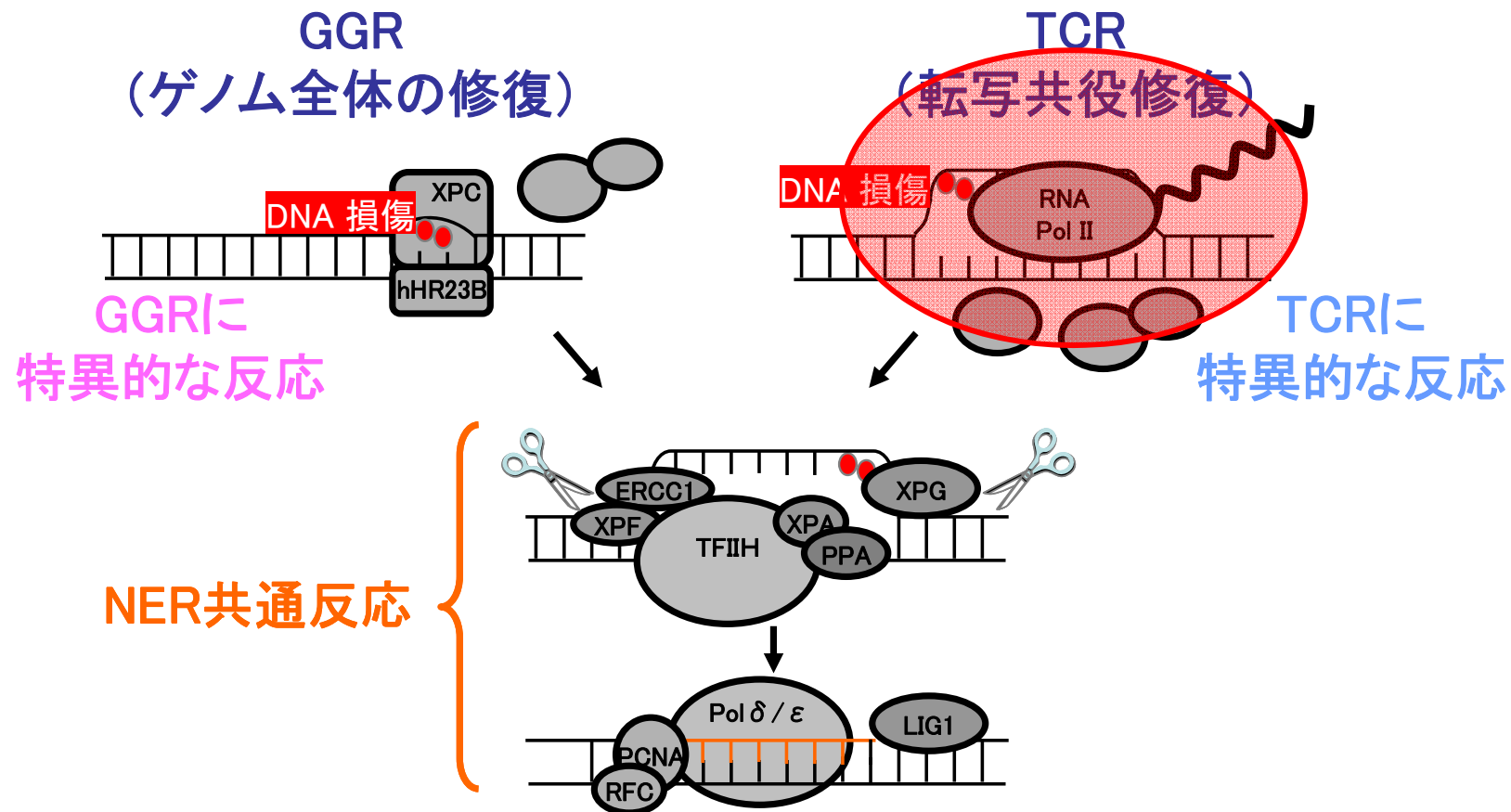
コロニー形成能を指標とした評価へ

紫外線感受性の検証



ノックダウンにより紫外線感受性が増加

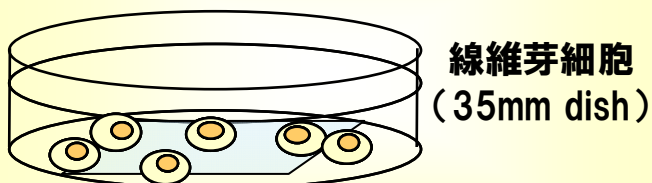
Nucleotide Excision Repair パスウェイに着目した解析



TCRに特異的なパスウェイが
正常細胞の紫外線感受性を制御するターゲットでは？

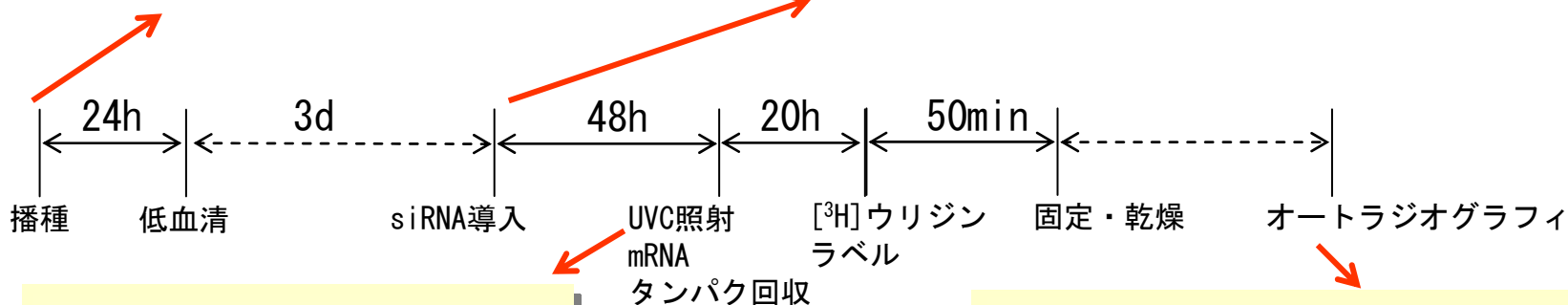
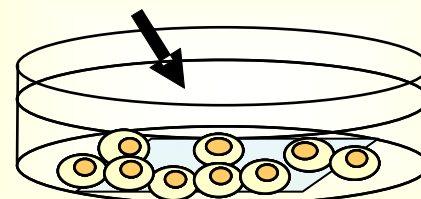
TCR活性の評価へ (RNA合成回復試験)

① 5.0×10^4 cells/dishで
カバーガラス上に播種

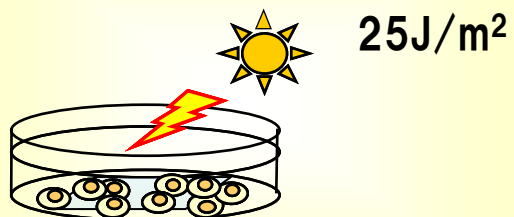


翌日から低血清(1%FBS)で3日間培養

② siRNAトランスフェクション



③ 紫外線(UVC)を照射

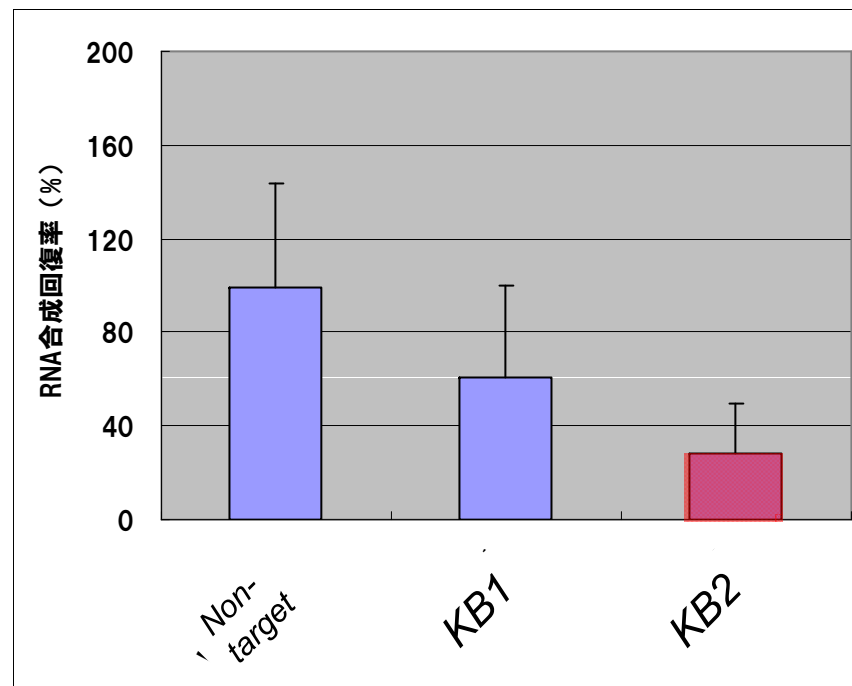
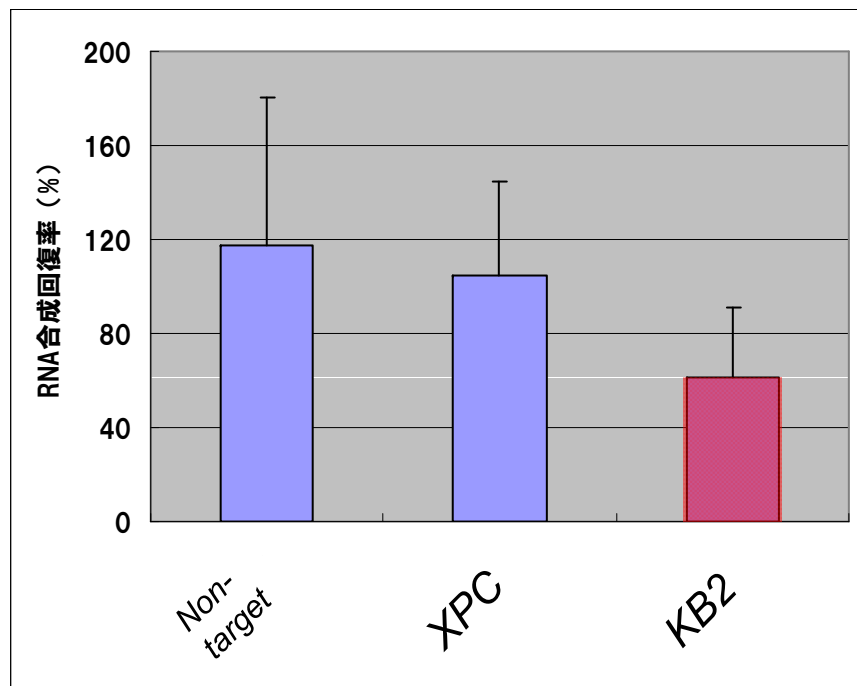


(タンパク、RNAも回収)

④ [³H]ウリジンでRNAをラベル、
固定後に *in situ* でオートラジオグラフィ
薄膜フィルム(乳剤)



siRNA 導入 / RNA合成回復試験



KB2 ノックダウンで特に顕著にTCR活性が低下
⇒ KB2 をターゲットとして素材探索評価系の構築へ

KB2 をターゲットとした素材探索評価系の構築



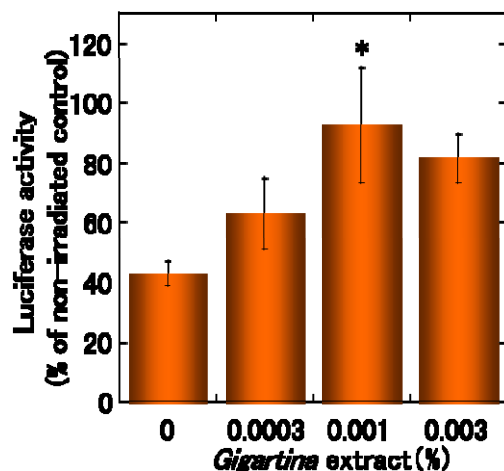
短期的開発視点では植物エキスより、
中・長期的開発視点では化合物よりスクリーニングを開始する

KB2 を過剰発現させたときの紫外線抵抗性を検証

KB2 をターゲットとした化粧品素材開発／実用化第一弾に向けて

DNA 修復に着目した化粧品開発事例

DNA 修復促進効果のある
化粧品素材開発



Impress、SENSAI ブランドに応用



同様のスキームで、
実用化第一弾は、
KB2 の産生を促進する
素材を開発し、
これを配合した化粧品開発を
目指す。

研究のまとめと展望

- 紫外線感受性と紫外線応答パスウェイの関係を解析し、Nucleotide Excision Repair (NER)パスウェイに新知見を見出した。
- NER パスウェイのうち TCR 特異的なパスウェイが正常細胞の紫外線感受性を制御可能と示唆された。
- TCR 特異的パスウェイの解析から KB2 遺伝子の発現低下が紫外線感受性を亢進させることを見出した。
- KB2 をターゲットとした素材スクリーニング系を構築した。
- 今後、短期的開発視点では植物エキスより、中・長期的開発視点では化合物よりスクリーニングを開始する
- その他、未報告の紫外線応答パスウェイ解析、メラニン制御パスウェイ解析等の基盤となる技術を開発した。