

「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」
事後評価報告書

平成22年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

平成22年11月

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 村田 成二 殿

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会 委員長 西村 吉雄

NEDO技術委員・技術委員会等規程第32条の規定に基づき、別添のとおり
評価結果について報告します。

目 次

はじめに	1
分科会委員名簿	2
審議経過	3
評価概要	4
研究評価委員会におけるコメント	7
研究評価委員会委員名簿	8
第1章 評価	
1. プロジェクト全体に関する評価結果	1-1
1. 1 総論	
1. 2 各論	
2. 個別テーマに関する評価結果	1-15
2. 1 デバイス・ハイスループット関連技術開発	
2. 2 時系列測定技術開発	
2. 3 応用研究（臨床応用、創薬、機能性化粧品等）	
3. 評点結果	1-30
第2章 評価対象プロジェクト	
1. 事業原簿	2-1
2. 分科会における説明資料	2-2
参考資料1 評価の実施方法	参考資料 1-1
参考資料2 評価に係る被評価者意見	参考資料 2-1

はじめに

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構においては、被評価プロジェクトごとに当該技術の外部専門家、有識者等によって構成される研究評価分科会を研究評価委員会によって設置し、同分科会にて被評価対象プロジェクトの研究評価を行い、評価報告書案を策定の上、研究評価委員会において確定している。

本書は、「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」の事後評価報告書であり、第25回研究評価委員会において設置された「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」（事後評価）研究評価分科会において評価報告書案を策定し、第26回研究評価委員会（平成22年11月11日）に諮り、確定されたものである。

平成22年11月
独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
研究評価委員会

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 研究評価委員会
「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」(事後評価)

分科会委員名簿

(平成22年6月現在)

	氏名	所属、役職
分科会長	つじもと とうぞう 辻本 豪三	京都大学 大学院薬学研究科 創薬科学専攻 ゲノム創薬科学分野 教授
分科会長 代理	あきやま てつ 秋山 徹*	東京大学 分子細胞生物学研究所 所長 教授
委員	くらた ひろゆき 倉田 博之	九州工業大学 大学院情報工学研究院 生命情報工学研究系 教授
	たみや えいいち 民谷 栄一*	大阪大学 大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 教授
	ながの けいじ 永野 恵嗣	株式会社 スリー・ディー・マトリックス 代表取締役会長
	まつだ ひでお 松田 秀雄*	大阪大学 大学院情報科学研究科 バイオ情報工学専攻 教授
	みずぐち ひろゆき 水口 裕之*	大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野 教授、 独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤的研究部 肝細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

敬称略、五十音順

注*：実施者の一部と同一組織であるが、「NEDO 技術委員・技術評価委員規程(平成22年7月1日改正)」第34条(評価における利害関係者の排除)により、利害関係はないとする。

審議経過

- 第1回 分科会（平成22年8月6日）
 - 公開セッション
 - 1. 開会、分科会の設置、資料の確認
 - 2. 分科会の公開について
 - 3. 評価の実施方法について
 - 4. 評価報告書の構成について
 - 5. プロジェクトの概要説明
 - 6. プロジェクトの詳細説明
 - 7. 全体を通しての質疑
 - 8. まとめ・講評
 - 9. 今後の予定、その他、閉会

- 第26回研究評価委員会（平成22年11月11日）

評価概要

1. 総論

1) 総合評価

健康安心プログラム達成を目指したセルアレイを中心とする本技術開発は、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療また抗体・核酸医薬開発等に広く知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬力、国際競争力の向上に大いに資する事業であり、NEDOの事業として妥当である。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た。その結果、独自技術であるセルアレイ技術を核として、近年のゲノム創薬の最も重要な病態パスウェイ情報取得に関して非常に有効な方法論を確立し、時間分解能を持った病態、薬効パスウェイ解析をウェットとドライ生物学技術を融合させて可能にしたことは、今後の創薬研究を加速するものとして高く評価できる。さらに、実用化イメージは明確であり、今後、本技術がより簡便に創薬支援技術として製薬メーカーなどで実用化されれば、我が国の創薬レベルの向上、国際競争力の向上にも繋がると期待できる。

しかしながら、本プロジェクトでの特許件数は少ない。また、知財戦略に欠けていた。バイオ事業の実現化には、特許戦略は必須のものである。プロジェクト全体の知財戦略に関してNEDOによるサポートが望まれる。

2) 今後に対する提言

本事業では様々な魅力的で有用な技術が開発されたが、この成果を可能な限り各方面に周知、また公開するとともに、広く共同研究を展開してわが国の創薬力向上に繋がることを期待する。そのために、関連する学会でのワークショップの企画等を通じて研究の成果をより広く発信し、事業推進者間での連携研究にとどまらず、広く諸分野の研究者に開発された技術を知らしめ、共同研究として実際に使用してもらうことにより、いろいろな分野の研究者に実際に使用してもらい、相互のやりとりを通してさらに改良していくプロセスが重要である。また、機能的食品など単一ではなく複合的な効果の解析が必要な分野も展開可能であろう。創薬以外の分野に関しても応用が期待出来る。

2. 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心プログラム達成を目指したセルアレイを中心とする本技術開発は、創薬の開発効率の向上、動物実験の削減等の問題を解決する基盤的かつ汎用的技術開発であり、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療また抗体・核酸医薬開発等に広く知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬力、国際競争力の向上に大いに資する事業である。特に、新規な細胞デバイスの開発やパスウェイ解析などの新機軸をめざした、基礎と応用、ドライとウェットが緊密に連携をとり医療の革新をめざす斬新な事業で、民間・大学研究室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った。また、アレイ解析後の機能解析法（遺伝子絞り込み法）に関しては、現在現場が最も困っている課題に焦点を絞った適切な研究テーマである。

2) 研究開発マネジメントについて

わが国のゲノム創薬基盤技術開発として、その開発目標、開発計画は、ゲノム創薬の研究開発効率を上げるための戦略的な目標が設定されており、妥当であったと判断する。また、大学、企業、研究機関、病院から異なる分野の専門家が集まった研究開発実施の事業体制も妥当であり、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、実施者間の連携が十分に行われるように工夫された。さらに、情勢変化に対応し、迅速にテーマの修正を行ったことも高く評価される。

バイオ事業の実現化には特許戦略は必須のものである。しかし、本プロジェクトは知財戦略に欠けていた。プロジェクト全体の知財戦略に関して NEDO によるサポートが望まれる。

3) 研究開発成果について

プロジェクト全体は順調に進行しており、意欲的なテーマにドライとウェットの研究者が連携して取り組み、高い水準の優れた成果をあげており高く評価出来る。特に、デバイス関連技術開発（細胞アレイによるがん浸潤・転移能検出デバイス、癌細胞運動性評価チップ）は世界的に見ても十分に高い水準の成果を上げた。今後、この分野でさらに完成度を高め、世界的にリーダーシップを取り、日本のバイオインダストリーの優れたインフラにして欲しい。また、遺伝子導入技術、時系列測定技術、パスイ解析技術などは国際的にみても新規性と有用性の高い技術であり、世界最高水準にあると考えられる。

しかしながら、論文発表などの成果に比して特許申請が少ない。大学での知財の状況も考慮して、NEDOなどが支援できないかの検討も必要である。また、一般に向けての情報発信が不十分であった。研究成果を一般の研究者が利用できるように、実験プロトコルの書籍化やHPの充実などとともに、セルアレイ装置とそのソフトウェアを安価に提供して欲しい。

4) 実用化の見通しについて

一体型の製品という意味での実用化が難しいテーマも一部あるが、全体として日本の創薬基盤・支援技術のレベル向上の面で実用化が拡大すると期待できる。また、装置開発から機能評価までの一貫した取り組みは技術開発、人材育成にも寄与していると評価できる。特に、パスイ開発技術の一部は、世界的に使われている汎用数式処理パッケージソフトで採用される予定であることや、開発された技術を活用した創薬等への応用研究が数多く成されていることから、成果の実用化イメージ・出口イメージは妥当である。得られた成果は、さらに研究を積み重ね、関連研究領域に適用されることにより大きな影響を及ぼすものと期待される。

しかしながら、ユーザーが普遍的に使える技術とするための計測機器開発が予定期間内に完成度が高い状況まで至らなかった点は残念である。また商品化に際しては、計測の信頼性（ばらつきの問題）などについて十分に検討すべきである。

研究評価委員会におけるコメント

第26回研究評価委員会（平成22年11月11日開催）に諮り、了承された。研究評価委員会からのコメントは特になし。

研究評価委員会

委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所 属、役 職
委員長	西村 吉雄	学校法人早稲田大学大学院 政治学研究科 (科学技術ジャーナリスト養成プログラム) 客員教授
委員長 代理	吉原 一紘	オミクロンナノテクノロジージャパン株式会社 最高顧問
委員	安宅 龍明	オリンパスビジネスクリエイツ株式会社 事業企画本部 戦略探索部 探索2グループ シニアマネージャー
	伊東 弘一	学校法人早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
	大西 優	株式会社カネカ 顧問
	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 相談役
	小林 直人	学校法人早稲田大学 研究戦略センター 教授
	小柳 光正	東北大学未来科学技術共同研究センター 教授
	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科 精密機械工学専攻 教授
	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
宮島 篤	国立大学法人東京大学 分子細胞生物学研究所 教授	

第1章 評価

この章では、分科会の総意である評価結果を枠内に掲載している。なお、枠の下の「○」「●」「・」が付された箇条書きは、評価委員のコメントを原文のまま、参考として掲載したものである。

1. プロジェクト全体に関する評価結果

1. 1 総論

1) 総合評価

健康安心プログラム達成を目指したセルアレイを中心とする本技術開発は、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療また抗体・核酸医薬開発等に広く知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬力、国際競争力の向上に大いに資する事業であり、NEDOの事業として妥当である。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た。その結果、独自技術であるセルアレイ技術を核として、近年のゲノム創薬の最も重要な病態パスウェイ情報取得に関して非常に有効な方法論を確立し、時間分解能を持った病態、薬効パスウェイ解析をウェットとドライ生物学技術を融合させて可能にしたことは、今後の創薬研究を加速するものとして高く評価できる。さらに、実用化イメージは明確であり、今後、本技術がより簡便に創薬支援技術として製薬メーカーなどで実用化されれば、我が国の創薬レベルの向上、国際競争力の向上にも繋がると期待できる。

しかしながら、本プロジェクトでの特許件数は少ない。また、知財戦略に欠けていた。バイオ事業の実現化には、特許戦略は必須のものである。プロジェクト全体の知財戦略に関してNEDOによるサポートが望まれる。

〈肯定的意見〉

- 独自技術であるセルアレイ技術を核として、近年のゲノム創薬の最も重要な病態パスウェイ情報取得に関して非常に有効な方法論を確立している。時間分解能を持った病態、薬効パスウェイ解析をウェットとドライ生物学技術を融合させて可能にした点は高く評価でき、今後の創薬研究を加速するものとして高く評価できる。本技術がより簡便に創薬支援技術として製薬メーカーなどに実用化が移入できれば、我が国の創薬レベル向上、国際競争力の向上にも繋がると期待できる。
- 行きづまった創薬の現状を打破しようとする新たな試みで、限られた期限内に様々な手法、要素技術の開発に成功しており、高く評価できる。完成の域まで達しなかったプロジェクトも多いが、いずれも大変興味深い魅力的な試みで、さらに研究を継続することにより、大きな波及効果を生じる研究として完成されることが期待できる。
- ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームの流れでセルアレイを提案して、その有効性を抗がん剤への応答や紫外線応答という実例を示すことができた点は、優れた研究成果である。応用研究では、マイクロアレイだけでは見つけられなかったような、パクリタキセル感受性にかかわる遺伝

子をセルアレイの実験から見つけることできた。遺伝子発現の時系列変化を数学的に解析する代数方程式の最適化技術を構築して、汎用性のある形でまとめられたことは評価できる。

- 国プロとして、1社では出来ないような共通の創薬技術に関して非常に良いテーマを設定されて進められたという点は、評価出来る。課題の途中であえてパスウェイの展開を勇断された点は評価。
- プロジェクトのテーマはよく練られており、目的は野心的であり、バイオインダストリーの将来の発展に対し大きな貢献をもたらすものである。デバイス開発、薬学、バイオインフォマティクスなど異なる分野の専門家によるプロジェクトチームを編成し、運営したことは意義深い。時系列パスウェイ解析の成果の第一歩として、評価できる。
- 当該事業では、デバイス関連技術、時系列測定技術とそれを基にしたパスウェイ解析技術など多くの新規性・有用性の高い創薬関連技術が創出され、かつ、その技術を応用した研究事例が数多く示されていることなどから、創薬関連の総合的な研究プロジェクトとして大変インパクトのある成果をあげたと考えられる。
- パスウェイ解析により細胞機能（表現型）に関与する遺伝子を絞り込んでいく技術が開発されたことは素晴らしい。

〈問題点・改善すべき点〉

- プロジェクト全体は順調に進行しているものの、各要素技術の進捗に遅速があり、既に完成度の高いものと不十分なものが混在している。
- 時系列解析技術では、遺伝子発現量にべき乗がかかるような GAM 型の微分方程式を解くことができれば一層よいであろう。パクリタキセル感受性遺伝子、紫外線感受性遺伝子の同定をさらに精密に検討して、創薬につなげることが期待される。必要な知的財産については、権利化することが必要であろう。
- 特許などの成果は、不十分だが、今後の当該技術の発展の可能性を事業性の観点から高めてもらいたい。
- 知財戦略が無いことを挙げる。バイオ事業の実現化には、特許戦略は必須のものである。プロジェクト初期に特許戦略を立てるべきであり、プロジェクト全体の戦略に関して NEDO によるサポートが望まれる。日本の製薬企業の知財戦略は、主に小分子の物質特許の取得に終始し、バイオ医薬の開発に関してはまだナイーブと言わざるを得ない。ツールやパスウェイに関する特許に関しては、重要であるにもかかわらず興味を示さない。バイオインダストリーでは、いきなり最終製品が開発されるものではなく、各開発ステッ

で特許を取得していくことが事業化において重要である。これらに対し、NEDO がリードをとって知財戦略を策定し、プロジェクト内あるいはNEDO での特許に関する予算を設定する等により、日本の産業界にプラスになるように動くことを希望する。

- パスウェイ解析により細胞機能（表現型）に関与する遺伝子を絞り込んでいく技術が開発されたということであるが、具体例が少ないので、今後多くの研究者が使用したい場合に、具体的にどうすれば良いか？という点について不明瞭である。

〈その他の意見〉

- ・ 関連の技術として、たとえば、生細胞での複数の細胞内ターゲットを経時的に同時解析することができる **KineticScan HCS Reader**（カインテックスキャン・エイチシーエス・リーダー）があります。細胞内で発現させた **GFP** 融合タンパク質、細胞内オルガネラや細胞内イオンの動態解析などができるようです。このような製品とセルアレイの比較をした場合、セルアレイの優位性を検討する必要があります。

2) 今後に対する提言

本事業では様々な魅力的で有用な技術が開発されたが、この成果を可能な限り各方面に周知、また公開するとともに、広く共同研究を展開してわが国の創薬力向上に繋がることを期待する。そのために、関連する学会でのワークショップの企画等を通じて研究の成果をより広く発信し、事業推進者間での連携研究にとどまらず、広く諸分野の研究者に開発された技術を知らしめ、共同研究として実際に使用してもらい、いろいろな分野の研究者に実際に使用してもらい、相互のやりとりを通してさらに改良していくプロセスが重要である。また、機能的食品など単一ではなく複合的な効果の解析が必要な分野も展開可能であろう。創薬以外の分野に関しても応用が期待出来る。

〈今後に対する提言〉

- ・ ヒアリングでも各委員からの要望としてあったように、このプロジェクト成果を可能な限り各方面に周知、また公開するとともに、広く共同研究を展開してわが国の創薬力向上に繋げて貰いたい。
- ・ 本事業では様々な魅力的で有用と思われる技術が開発されたが、いろいろな分野の研究者に実際に使用してもらい、相互のやりとりを通してさらに改良していくプロセスが重要であると考えられる。事業推進者間での連携研究にとどまらず、広く諸分野の研究者に開発された技術を知らしめ、共同研究として実際に使用してもらうことが可能になるような仕組みをつくと良いと思われる。
- ・ 書籍等を通じて、セルアレイの装置や技術についてわかりやすく提供して欲しい。既存のマイクロアレイの装置等を用いて、セルアレイ装置をつくる事が出来れば便利である。ひとつの遺伝子発現の時系列解析はもちろん有用であるが、多数の遺伝子の発現をやはり観察したいという欲求は強い。
- ・ 今回得られた成果の展開に関しては、機能的食品など単一ではなく複合的な効果の解析が必要な分野もあり、創薬以外の分野に関しても応用が期待出来る。
- ・ この成果をオープンにし、種々の分野への展開を図ると同時に未成熟なところは次につながるようなプロジェクトへと展開されるよう期待する。
- ・ プロジェクト内で、特許費用の予算化が望まれる。NEDO とプロジェクトチームによる、初期段階での特許戦略の立案が望まれる。
- ・ 関連する学会でのワークショップの企画等を通じて、当該事業の成果をより広く発信していくことが望まれる。

- ・ 今後多くの研究者がこの技術を使用したい場合に、具体的にどう活用すれば良いかについて明らかになるようにし、シンポジウム等でこの技術を広めることをしていただきたい。

〈その他の意見〉

- ・ 本プロジェクトの各要素技術での成果は論文などでの発表が一部出つつあるが、特許件数が少ない。今後その点を NEDO 支援などで改善するとともに、全体技術を具体的に創薬に結びつけた成果を期待したい。

1. 2 各論

1) 事業の位置付け・必要性について

健康安心プログラム達成を目指したセルアレイを中心とする本技術開発は、創薬の開発効率の向上、動物実験の削減等の問題を解決する基盤的かつ汎用的技術開発であり、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療また抗体・核酸医薬開発等に広く知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬力、国際競争力の向上に大いに資する事業である。特に、新規な細胞デバイスの開発やパスウェイ解析などの新機軸をめざした、基礎と応用、ドライとウェットが緊密に連携をとり医療の革新をめざす斬新な事業で、民間・大学研究室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った。また、アレイ解析後の機能解析法（遺伝子絞り込み法）に関しては、現在現場が最も困っている課題に焦点を絞った適切な研究テーマである。

〈肯定的意見〉

- テーラーメイド医療・予防医療・再生医療また抗体・核酸医薬開発等に広く知見を与える事が期待できるとともに、我が国の創薬力、国際競争力の向上に大いに資する事業であり、「健康安心プログラム」で実施していることは適切である。セルアレイを中心とする本技術開発は、民間・大学研究室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ったと判断する。
- 基礎と応用、ドライとウェットが緊密に連携をとり医療の革新をめざす斬新な事業で、健康安心イノベーションプログラムの目標達成に寄与している。本事業の遂行は、民間のみでは不可能で、NEDOの関与があつて初めて可能であった。投じた予算との比較において十分な成果が得られたと考えられる。内外の技術開発動向、国際競争力の状況、市場動向、国際貢献の可能性等から見ても、本事業の目的は妥当である。
- 健康安心イノベーションプログラムの目標達成のために寄与している。創薬の開発効率の向上、動物実験の削減等の問題を解決する基盤的かつ汎用的技術開発なので、国のプロジェクトとしては妥当である。大学、企業、研究機関、病院（癌研究会）が共同で行って、適切な連携が出来ている印象を受けた。
- ゲノム創薬の流れのなかで、セルアレイは決定打となりうる技術であろう。
- 本課題は、民間だけでは実施が困難な課題であり、健康安心イノベーションプログラムに関するものとして十分寄与が行われた。
- 異なった専門家が集まったプロジェクトを良く運営し、成果を出している。将来のバイオ研究テーマとして、非常に良い。

- 当該事業では、デバイス関連技術、時系列測定技術とそれを基にしたパスイ解析技術など多くの新規性・有用性の高い創薬関連技術が創出され、かつ、その技術を応用した研究事例が数多く示されていることなどから、創薬関連の総合的な研究プロジェクトとして大変インパクトのある成果をあげたと考えられる。
- アレイ解析後の機能解析法（遺伝子絞り込み法）に関して、現在現場が最も困っていることに焦点した研究である。

〈問題点・改善すべき点〉

- プロジェクト過程にあっては“具体的、定量的な開発目標が必ずしも明確でない部分”もあったようであるが、中間評価後の軌道修正が的確に機能した様であり、開発課題の達成は予定通り進んだと判断できる。
- 一般に、国の予算をできるだけ節約して研究することがのぞましい。プロジェクトの研究開発効率については、評価会ではほとんど議論されなかったが、その点を考える必要があるのかもしれない。
- 費用対効果に関しては、現状では評価が困難であり、今後の発展が期待したい。
- NEDO およびプロジェクトチームからの実用化へのプレッシャーが強すぎるのではないかと考える。実用化においては、その方向に向かってプロジェクトが進んでいることが重要であり、例えば各段階での特許取得がこれに当たる。各エレメントにおいて、とってつけたような応用を付け加える必要はないのではないかと考える（複数パスイの組み合わせ阻害に関する応用研究、機能性化粧品の開発など）。真のブレークスルーを目指してほしい。
- 文科省新学術領域研究と同程度あるいはそれ以上の予算規模であるが、新学術領域研究がシンポジウム等で研究成果を積極的に発表しているのに比べ、本研究ではそれが乏しい。

2) 研究開発マネジメントについて

わが国のゲノム創薬基盤技術開発として、その開発目標、開発計画は、ゲノム創薬の研究開発効率を上げるための戦略的な目標が設定されており、妥当であったと判断する。また、大学、企業、研究機関、病院から異なる分野の専門家が集まった研究開発実施の事業体制も妥当であり、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、実施者間の連携が十分に行われるように工夫された。さらに、情勢変化に対応し、迅速にテーマの修正を行ったことも高く評価される。

バイオ事業の実現化には特許戦略は必須のものである。しかし、本プロジェクトは知財戦略に欠けていた。プロジェクト全体の知財戦略に関して NEDO によるサポートが望まれる。

〈肯定的意見〉

- わが国のゲノム創薬基盤技術開発として、その開発目標、開発計画は、概ね妥当であったと判断する。その予算、期間の点からも充分評価が出来る点に到達しており、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たものと評価できる。
- 研究開発目標、研究開発計画ともに妥当である。研究開発実施の事業体制も妥当であり、さらに実施者間の連携が十分に行われるように工夫されている。実用化に踏み出しているものも多々あり、順調であるが、特許取得数は少ない。世界の研究の進捗状況と社会のニーズを的確に把握し、適切に対応し一貫した研究を推進した。HTS・網羅的手法の限界を認識し、パスウェイ解析による創薬を目指したことは高く評価されてよい。
- ゲノム創薬の研究開発効率を上げるといふ、戦略的な目標が設定されている。
- パクリタキセル感受性遺伝子同定、紫外線感受性遺伝子同定、がんの浸潤、転移の観察という具体的応用例が用いて、セルアレイの実用化について定量的に評価している。時系列解析技術やパスウェイ推定技術は、高い精度であることを統計的に正確に評価している。大学、企業、研究機関、病院の研究開発チーム全体はよくまとまり、適材適所であったといえる。研究計画、実施、成果ともに適切にまとめられている。
- 創薬技術に関しては、世界的にも競合状態であり、新たな技術的ブレークスルーも求められる状況にある。その中で新規な細胞デバイスの開発やパスウェイ解析などの新機軸をめざした点は評価したい。

- 異なる分野の専門家が集まったプロジェクトチームにおいて、メンバーが集まり、議論する「場」を提供していることが、日本の研究開発の発展に貢献している。情勢変化に対応し、迅速にテーマの修正を行ったことは非常に好ましく感じる。
- 当該事業での目標設定と事業体制により、低侵襲高効率の遺伝子導入技術等のデバイス関連技術や、高分解能の時系列計測データによる新規パスウェイ解析技術の創出と、その技術を応用した既存抗がん剤感受性遺伝子の同定や紫外線感受性遺伝子の探索による機能性化粧品開発など、創薬において有用な新規技術と応用例が数多く示されたことから、研究開発マネジメントは妥当と考えられる。
- 十分な研究体制、組織となっている。

〈問題点・改善すべき点〉

- 企業などに使用可能な技術は、全体の完成を待たずもっと早めに移行しても良かったと思うが、これは **NEDO** の支援である性格上困難なことであったのでしょうか？
- 成果の実用化につなげる戦略については、今後を期待する。
- 成果の実用化につなげる知財マネジメントについても今後を期待する。
- 実質的な成果は、これから見込める状況であり、時間不足の観があるが、今後の展開を期待したい。
- 知財マネジメント、実用化に関しては、総論に示した通りである。 *
総論の転記*

知財戦略が無いことを挙げる。

バイオ事業の実現化には、特許戦略は必須のものである。プロジェクト初期に特許戦略を立てるべきであり、プロジェクト全体の戦略に関して **NEDO** によるサポートが望まれる。

日本の製薬企業の知財戦略は、主に小分子の物質特許の取得に終始し、バイオ医薬の開発に関してははまだナイーブと言わざるを得ない。ツールやパスウェイに関する特許に関しては、重要であるにもかかわらず興味を示さない。バイオインダストリーでは、いきなり最終製品が開発されるものではなく、各開発ステップで特許を取得していくことが事業化において重要である。これらに対し、**NEDO** がリードをとって知財戦略を策定し、プロジェクト内あるいは **NEDO** での特許に関する予算を設定する等により、日本の産業界にプラスになるように動くことを希望する。

- 4年目の予算規模の縮小が原因とはいえ、本技術を具体的に活用していた製薬企業が脱退したことは残念である（具体例が多い方が、多くの他の研究者への参考となるから）。

〈その他の意見〉

- ・ 中間評価で、2社がプロジェクトから離脱していたが、その理由について尋ねることを忘れた。
- ・ バイオインダストリーと、エレクトロニクスや素材産業とは、実用化の意味合いが異なるのではないかと考える。すなわち、各エレメントの応用実用化ではなく、各段階での特許取得や産業界でのノウハウ蓄積がより重要であると考ええる。

3) 研究開発成果について

プロジェクト全体は順調に進行しており、意欲的なテーマにドライとウェットの研究者が連携して取り組み、高い水準の優れた成果をあげており高く評価出来る。特に、デバイス関連技術開発（細胞アレイによるがん浸潤・転移能検出デバイス、癌細胞運動性評価チップ）は世界的に見ても十分に高い水準の成果を上げた。今後、この分野でさらに完成度を高め、世界的にリーダーシップを取り、日本のバイオインダストリーの優れたインフラにして欲しい。また、遺伝子導入技術、時系列測定技術、パルスウェイ解析技術などは国際的にみても新規性と有用性の高い技術であり、世界最高水準にあると考えられる。

しかしながら、論文発表などの成果に比して特許申請が少ない。大学での知財の状況も考慮して、NEDOなどが支援できないかの検討も必要である。また、一般に向けての情報発信が不十分であった。研究成果を一般の研究者が利用できるように、実験プロトコルの書籍化やHPの充実などとともに、セルアレイ装置とそのソフトウェアを安価に提供して欲しい。

〈肯定的意見〉

- 開発課題の達成は概ね予定通り進んだと判断する。トランスフェクション技術開発が特に安定して開発が進んでいると評価できる。siRNAは核酸医薬として医療応用が期待されるが創薬研究を促進する上でも貢献は大きいと評価できる。また研究業績は、多数の論文にまとめられ、学会発表と併せ事業の成果は十分に上がっていると評価する。
- 意欲的なテーマにドライとウェットの研究者が連携して取り組み、高い水準の優れた成果をあげており高く評価される。得られた成果は、さらに研究を積み重ね、関連研究領域に適用されることにより大きな影響を及ぼすものと期待される。
- セルアレイの提案、その利用法を多角的に検討して、その有効性を示すことができている。セルアレイの市場の創造につながることを期待できる。汎用性の高い技術なので、さまざまな応用が期待できる。
- 細胞デバイスなどは、世界的に見ても十分に高い水準の成果を上げている。
- デバイス関連技術開発（セルアレイによるがん浸潤・転移能検出デバイス、癌細胞運動性評価チップ）は大きな進歩であり、実用化に関して成功であると思われる。この分野でさらに完成度を高め、世界的にリーダーシップを取り、日本のバイオインダストリーの優れたインフラにしてほしいものと思う。パルスウェイ解析に関しては、将来的に多くの結果が得られていくものと思われるが、現時点での成果のサンプルとしても高く評価できるものである。

- 当該事業で開発された遺伝子導入技術、時系列測定技術、パスウェイ解析技術などは国際的にみても新規性と有用性の高い技術であり、世界最高水準にあると考えられる。
- これまでにない技術である。

〈問題点・改善すべき点〉

- 上述したが、論文発表などの成果に比して、特許申請が少ない。ヒアリングにおいて、大学で現在知財の継承が困難である状況説明があったが、その点を NEDO などが支援できないか検討をして欲しい。
- 特許が少ない。一般に読まれるいわゆる著名誌にも論文がほしかった。情報発信の努力は十分でなかったように思われる。最低限HPには、参加研究者のHPにリンクをはってほしい。海外派遣により得られた情報の中には興味深いものもあり、(公開できるものは) HPで公開すれば有用であったと思う。
- セルアレイ装置とそのソフトウェアを全体提供する戦略について説明してほしい。安価に提供して欲しい。研究成果を一般の研究者が利用できるように、わかりやすい説明が必要である。実験プロトコルの書籍などは有効な方法であろう。
- 特許件数が少ないと言う指摘があった。
- プロジェクトのスコープが拡がり、時間的制約もあったため、応用研究がとってつけた感がある。
- 一般に向けての情報発信の点では、不十分である。

〈その他の意見〉

- ・ 極めて有用な技術を開発しているので、さらにいろいろな研究者と連携して、いろいろな実験系に適用してみることが期待される。モニターを公募していろいろな研究者に使用してもらおうといったことも考えられる。

4) 実用化の見通しについて

一体型の製品という意味での実用化が難しいテーマも一部あるが、全体として日本の創薬基盤・支援技術のレベル向上の面で実用化が拡大すると期待できる。また、装置開発から機能評価までの一貫した取り組みは技術開発、人材育成にも寄与していると評価できる。特に、パスウェイ開発技術の一部は、世界的に使われている汎用数式処理パッケージソフトで採用される予定であることや、開発された技術を活用した創薬等への応用研究が数多く成されていることから、成果の実用化イメージ・出口イメージは妥当である。得られた成果は、さらに研究を積み重ね、関連研究領域に適用されることにより大きな影響を及ぼすものと期待される。

しかしながら、ユーザーが普遍的に使える技術とするための計測機器開発が予定期間内に完成度が高い状況まで至らなかった点は残念である。また商品化に際しては、計測の信頼性（ばらつきの問題）などについて十分に検討すべきである。

〈肯定的意見〉

- 実用化イメージは明確である。一体型の製品という意味での実用化が難しいテーマも一部あるが、全体として日本の創薬基盤・支援技術のレベル向上の面で実用化が拡大すると期待できる。また、装置開発から機能評価までの一貫した取り組みは技術開発、人材育成にも寄与していると評価できる。
- 機器としてあるいはソフトとして着実に実用化の道を歩んでおり、関連分野に大きな波及効果を生じることが期待できる。本事業のように異なる分野の連携による研究開発は、人材育成の促進という面でも貴重な波及効果を生じると考えられる。
- 研究装置，研究技術開発という点で，実用化イメージは明確である。
- セルアレイシステムのテクニカルな問題点を解決して，応用例を増やすことが大切であろう。
- 実用化に向けた要素技術が確立され、今後への開発の見通しは立っている。
- 出口イメージは明確である。セルアレイの技術が完成すれば、世界中で多くの研究者が利用するものとなり、関連分野への波及効果も大きく、人材育成を促進すると考える。本分野は、日本が得意とし、リーダーシップを取れるものであり、積極的に優位性をとっていくべきである。

- 当該事業で開発されたパスイメージ開発技術の一部は、世界的に使われている汎用数式処理パッケージソフトで採用される予定であることや、開発された技術を活用した創薬等への応用研究が数多く成されていることから、成果の実用化イメージ・出口イメージは明確であり、関連分野への波及効果も十分期待できると考えられる。
- この技術がきっちりと確立され、それが広まり、具体的な方策が明示されれば(この点には、今度も努力が必要)波及効果は大きくなる可能性がある。

〈問題点・改善すべき点〉

- ユーザーが普遍的に使える技術とするための計測機器開発が予定期間内に完成度が高い状況まで至らなかった点は残念である。また商品化に際しては、計測の信頼性（ばらつきの問題）などについて十分に検討すべきである。
- 本技術への創薬への展開は始まったところであり、今後への期待が大きい。
- 5年間のプロジェクトで行うにとしては、テーマがアグレッシブに過ぎ、幅広すぎたと思われる。
- 現時点ではまだ、実用化イメージ・出口イメージが具体的につかめない。

〈その他の意見〉

- ・ セルアレイがさらに正確で定量性の高い測定システムとなることを期待する。
- ・ 生物実験と情報の組み合わせによって、データ解析の信頼性が非常にあがっているのので、さらにこの方向性で研究を進めてほしい。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発を促進するかどうかは今後の活動次第である。人材育成を促進するなどの波及効果を生じているかは不明。

2. 個別テーマに関する評価結果

2. 1 デバイス・ハイスループット関連技術開発

1) 成果に関する評価

トランスフェクションアレイ技術開発を我国の独自基盤技術として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がる事業としては高く評価できる。特に、浮遊系細胞、接着系細胞を固定する技術を開発し、細胞の種類を選ばずに低侵襲的に遺伝子導入できる新規技術を開発したことは世界最高水準の成果が得られていると判断できる。また、遺伝子発現・抑制の同期化技術は極めて魅力的な研究で、蛍光タンパク質発現のダイナミクスを同期化する技術の開発は、時系列解析を行うために非常に大切である。さらに、セルアレイによるがん浸潤・転移能検出デバイス、癌細胞運動性評価チップは、実用化に近い域に達しており、RNAiを用いた大規模スクリーニングなどへの応用が大いに期待される。

しかしながら、研究の成果が特許などの知財へと十分に反映されておらず、なお一層の工夫、努力が欲しかった。また、プロジェクトの成果を幅広く研究者や一般に発表しプロモーションする場を持つなどの、研究成果の宣伝が足りなかった。トランスフェクションアレイ技術開発は、一部他省庁等の国家プロジェクトなどでも実施されている。お互いの情報交換を行い、認知度を高める工夫が欲しい。

〈肯定的意見〉

- トランスフェクションアレイ技術開発を我国の独自基盤技術として開発、確立し、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としては高く評価できる。今後、「健康安心プログラム」の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。また、細胞ネットワーク解析のためのウェット技術として、その開発は世界でまだ実現されていない細胞レベルでのパスウェイ創薬を可能とする技術として大変興味深い。
- 重要かつ適切なテーマが設定され、十分な成果があがっている。癌細胞運動性評価チップ、浸潤性評価チップに関しては実用化に近い域に達しているように思われ、RNAiを用いた大規模スクリーニングなどへの応用が大いに期待される。遺伝子導入デバイスは低侵襲である点に大きな魅力がある。導入効率はもう少し高くなってほしい。遺伝子発現・抑制の同期化技術は極めて魅力的な研究で、さらに改良されることが期待される。光照射前の転写抑制率が低いのは、細胞内に導入され例えばストレプトアビジンが分解を受ける等のためである可能性はないか

- セルアレイのデバイスは工夫されている。蛍光タンパク質の画像測定、浸潤や運動の観測などが行える。浮遊系細胞，接着系細胞を固定する技術を開発した。遺伝子導入効率を向上させることに成功している。
- また，蛍光タンパク質発現のダイナミクスを同期化する技術の開発は，時系列解析を行うために非常に大切である。
- ガン細胞浸潤・転移能評価デバイス、遺伝子導入デバイス、遺伝子発現・抑制同期化技術など何れも水準の高い成果をあげており、発表学術論文のレベルも高い。
- デバイス関連技術開発（セルアレイによるがん浸潤・転移能検出デバイス、癌細胞運動性評価チップ）は大きな進歩であり、実用化に関して成功であると思われる。
- 精度・再現性を追求し、完成度を高める必要はあるが、成果は市場の拡大に貢献するものである。
- これまで導入が難しかった筋肉細胞等でも遺伝子導入できるなど、細胞の種類を選ばずに遺伝子導入できる新規技術を開発したことなどから、世界最高水準の成果が得られていると考えられる。

〈問題点・改善すべき点〉

- 知財化、実用化に関してなお一層の工夫、努力が欲しかった。
- トランスフェクションアレイ技術開発は、一部他省庁等の国家プロジェクトなどでも実施されている。お互いの情報交換を行い、認知度を高める工夫が欲しい。
- 一般の **USER** が簡便に利用できるデバイス開発を期待する。セルアレイプロトコルのような書籍を販売して、だれでも使えるように普及する必要がある。
- 特許などの知財へと十分に反映されていないのが残念である。
- プロジェクト全体で特許に関する予算を設定し、知財戦略を行うべきである。現在、各大学の **TLO** は体力が弱体化しており、すぐファイナンスがつく特許のみを権利化する傾向がある。バイオインダストリーの将来を展望すると、**NEDO** 等公的分野が積極的に特許に関してはサポートするべきであると考ええる。
- 工学系の研究者を中心に、この手の研究は非常に多いが、実際に役に立っている（実用化されている）技術は極めて少ない。本研究も現時点では、それら多くの研究より上をいっているという印象は乏しい。

〈その他の意見〉

- せっかくの研究成果の宣伝が足りないように感じた。共同研究者をつのり組織的にいろいろな系で試す等してもよいのでは？
- 論文発表に関しては、専門家ではないので、コメントを控える。
- 成果を幅広く、研究者や一般に発表し、プロモーションする場を持つべきであるとする。

2) 実用化の見通しに関する評価

セルアレイの基礎的要素技術として、実用化イメージは具体的であり、得られた細胞デバイスの要素技術は、実用化技術として十分に寄与すると期待できる。特に、癌細胞運動性評価チップ、浸潤性評価チップは実用化に近い域に達している。また、がん細胞の運動性を一細胞ごとに解析できる技術や、細胞の種類を選ばない低侵襲かつ高効率の遺伝子導入デバイスの開発など、実用性と有用性の高い技術が開発されている点が高く評価できる。技術が完成すれば、世界中で多くの研究者が利用するものとなり、関連分野への波及効果も大きく、人材育成を促進すると考える。本分野は、日本が得意とし、リーダーシップを取れるものであり、積極的に優位性をとっていくべきである。

今後実用化されるためには、遺伝子導入効率の改善等、個々の技術を飛躍的に高め、さらにいろいろな細胞、系に適用して実績を積む必要がある。また、タンパク質の時系列データはどの程度まで同期化できるかを明確にし、情動的解析にできるだけ精度の高いデータを供給することが重要である。一方、広く製薬企業等でこの開発技術が用いられるには、より具体的なシステムのスタンダードマニュアル化、パッケージ化が必須と考える。

〈肯定的意見〉

- 解析結果が標準化され、ネットワーク解析の実用化が容易になったと評価できる。その技術の実用化イメージも明確である。
- 癌細胞運動性評価チップ、浸潤性評価チップは実用化に近い域に達しているように思われた。これらの技術を諸分野に普及することにより大きな波及効果を及ぼすことができると考えられる。当該分野の研究開発や人材育成を促進するという波及効果も生じている。
- セルアレイの基礎的要素技術として、実用化イメージは具体的である。
- 得られた細胞デバイスの要素技術は、実用化技術として十分に寄与すると期待できる。
- 出口イメージは明確である。
- セルアレイの技術が完成すれば、世界中で多くの研究者が利用するものとなり、関連分野への波及効果も大きく、人材育成を促進すると考える。本分野は、日本が得意とし、リーダーシップを取れるものであり、積極的に優位性をとっていくべきである。
- がん細胞の運動性を一細胞ごとに解析できる技術や、細胞の種類を選ばない低侵襲かつ高効率の遺伝子導入デバイスの開発など、実用性と有用性の高い技術が開発されている点が高く評価できる。
- 良い技術が開発されれば、波及効果は大きくなる可能性あり。

〈問題点・改善すべき点〉

- 広く製薬企業等でこの開発技術が用いられるには、より具体的なシステムのスタンダードマニュアル化、パッケージ化が必須と考えられる。
- タンパク質の時系列データはどの程度まで同期化できるのだろうか。情報解析にできるだけ精度の高いデータを供給することが重要であろう。理論的に可能な同期化のレベルと実験データを比較することができれば有用であろう。複数の時系列データが取得できれば、もっと生物学的知識を発見できるであろう。
- 技術を波及するために何が必要なかを明確にしていくことが大切であろう。
- 実用化イメージ・出口イメージは見えない。実用化されるためには、個々の技術の効率を飛躍的に高める必要あり。

3) 今後に対する提言

今後、開発されたデバイス関連技術について、効率を改善や精度、再現性を高めること、さらにいろいろな細胞、系に適用して実績を積み、汎用性をより深く調査することが望まれる。また、医学生物学分野の研究者に積極的に宣伝して、研究成果の認知度を上げ、また技術の普及に努めて、波及効果を高める努力が求められる。単に知識の積み重ねにとどまらず、創薬の現場で用いられる有効性のある技術として確立、実証されることが望まれる。究極、既知のパスウェイを確認することよりも、新規のパスウェイの発見や、実際に創薬へ繋がった成功例を出すことが最重要であろう。

これらが達成されれば、「健康安心プログラム」の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。また、細胞ネットワーク解析のためのウェット技術として、その開発は世界でまだ実現されていない細胞レベルでのパスウェイ創薬を可能とする技術として大変興味深い。

〈今後に対する提言〉

- ・ 研究成果の認知度を上げ、また技術の普及に努めて、波及効果を高める努力が求められる。単に知識の積み重ねにとどまらず、創薬の現場で用いられる有効性のある技術として確立、実証されることが望まれる。究極、既知のパスウェイを確認することよりも、新規のパスウェイの発見や、実際に創薬へ繋がった成功例を出すことが最重要であろう。
- ・ さらにいろいろな細胞、系に適用して実績を積むことを期待したい。遺伝子導入デバイスの導入効率を改善することが望ましい。遺伝子発現・抑制の同期化技術のさらなる改良を期待したい。今回開発した技術を広く諸分野に普及するための努力が期待される。特に、医学生物学分野の研究者は、このような技術開発に関する論文を掲載する **Journal** に目を通すことはほとんどないと思われるので、積極的に宣伝していただくと大変有り難い。セルアレイプロトコルのような書籍を販売して、だれでも使えるように普及する必要がある。遺伝子導入が低い細胞への適用、ケージド化合物によるバックグラウンド発現量の抑制など、実用化に向けた今度の展開を期待する。精度、再現性を高め、積極的に実用化に近づけてほしい。
- ・ 開発されたデバイス関連技術について、より多くの種類の細胞に適用するなど、汎用性をより深く調査することが望まれる。
- ・ 実用化されるためには、更に効率を飛躍的に高める必要があり、それは技術的に可能か？

2. 2 時系列測定技術開発

1) 成果に関する評価

生きた細胞での遺伝子発現を高い時間分解能で計測できる時系列測定技術と、それにより得られた計測データからパスウェイを動的かつ定量的に解析できるネットワーク動態解析技術を開発した。分子生物学的観点から「細胞」の機能変化についての計算機予測としては目標値を十分にクリアしており、国際的にみても類のない独創的な成果である点が高く評価できる。特に、微分方程式を代数方程式に変換して、時系列の幾何学的特徴を考慮する最適化モデルとしたことは、画期的方法である。微弱な蛍光の時系列計測イメージングに技術開発と活性化パスウェイの定量解析のためのネットワーク技術を連携させ、リン酸化カスケードなどの創薬ターゲットへと展開した成果は大きい。また、ウェットとドライが上手くかみ合った成果を具体的に海外ソフトに組み込まれる予定であることは高く評価できる。

今後、具体的なウェット実験へのフィードバックに本当の意味で支援になっていない点の原因を明らかにするとともに、真に細胞ネットワークをシミュレーションできるものにして欲しい。また、GMA（質量作用則）のようなべき乗を含む微分方程式に適用できると一層有用である。

一方、一般に向けての情報発信については不十分であった。研究成果を一般の研究者が利用できるように、わかりやすい説明があるとなお良い。

〈肯定的意見〉

- 分子生物学的観点から「細胞」の機能変化についての計算機予測は評価に値する。ウェットとドライが上手くかみ合って成果を出している。具体的に海外ソフトに組み込まれた実績は高く評価できる。
- 生きた細胞内の活性化ネットワークの同定を可能にする極めて重要でレベルの高い技術開発であると考えられる。限られた年限での目標値を十分にクリアしていると考えられる。これらの成果は新たな技術領域を開拓し、医学生物学の諸分野に広く普及されることが期待される。
- 微分方程式を代数方程式に変換して、時系列の幾何学的特徴を考慮する最適化モデルとしたことは、画期的方法である。
- 実験モデルを用いて、提案した情報技術の妥当性が統計的指標を用いて示されている。
- 微弱な蛍光の時系列計測イメージングに技術開発と活性化パスウェイの定量解析のためのネットワーク技術を連携させ、リン酸化カスケードなどの創薬ターゲットへと展開した成果は大きい。

- 成果を達成しており、市販ソフトウェアにプログラムが組み込まれている点で、実用化も達成している。
- 生きた細胞での遺伝子発現を高い時間分解能で計測できる時系列測定技術と、それにより得られた計測データからパスウェイを動的かつ定量的に解析できるネットワーク動態解析技術を開発しており、国際的にみても類のない独創的な成果である点が高く評価できる。
- 新しい考え方に基づく技術である。

〈問題点・改善すべき点〉

- 具体的なウェット実験へのフィードバックに本当の意味で支援になっていない点の原因を明らかにするとともに、真に細胞ネットワークをシミュレーションできるものにして欲しい。
- GMA（質量作用則）のようなべき乗を含む微分方程式に適用できると一層有用であろう。
- アルゴリズムに関しては専門外のため、コメントを差し控える。一般に向けての情報発信については不十分。

2) 実用化の見通しに関する評価

実用化イメージは明確であり、ネットワーク動態解析技術の基盤部分である数理モデリング手法が世界的に使われている汎用数式処理パッケージソフト(MAPLE)に組み込まれる予定であるなど、既に具体的な出口に至っている。また、当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果も生じている。今後、日本のソフトウェアに組み込まれるようにしていただきたい。

〈肯定的意見〉

- 実用化イメージは明確。既に具体的な出口に至っている。
- Mapleに取り込まれるなど着実に実用化の道を歩んでおり、関連分野に大きな波及効果を生じることが期待できる。当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果も生じている。
- MAPLEに組み込まれると聞いたので、技術レベルが高いことがうかがえる。実用化されたといえるが、日本のソフトウェアであればもっとよいであろう。
- 開発した解析ソフトウェアの配布なども実施しており、成果の波及効果が期待される。
- 市販ソフトウェアにプログラムが組み込まれており、利用されていることは高く評価できる。
- ネットワーク動態解析技術の基盤部分である数理モデリング手法は、世界的に使われている汎用数式処理パッケージソフトに組み込まれる予定であるなど、実用性は極めて高い。

〈問題点・改善すべき点〉

- 具体例が乏しいため、実用化イメージ・出口イメージは不明瞭。

〈その他の意見〉

- ・ 実用化されれば、極めて有用な技術となる可能性があり、是非今後も積極的に取り組んで頂きたい。

3) 今後に対する提言

具体的なウェット実験へのフィードバックに本当の意味で支援になっていない点の原因を明らかにするとともに、真に細胞ネットワークをシミュレーションできるものにして欲しい。また様々な分野の研究に適用し、パスウェイの事例をさらに増やすなど当該技術の活用事例を増やし、より汎用的な細胞内ネットワーク解析ツールとしての実証を期待する。そして、研究者間で相互に情報をやりとりすることによりさらに改良し、多様な細胞機能のアウトプットに対応できる、インテリジェントなシステム構築を期待する。さらに、セミナー等を通じて、プロジェクトの成果を広く紹介し、一般研究者がどのようにこの技術を活用すればよいかを明確にして欲しい。

〈今後に対する提言〉

- ・ 具体的なウェット実験へのフィードバックに本当の意味で支援になっていない点の原因を明らかにするとともに、真に細胞ネットワークをシミュレーションできるものにして欲しい。また、多様な細胞機能のアウトプットに対応できる、インテリジェントなシステム構築を期待する。様々な分野の研究に適用し、研究者間で相互に情報をやりとりすることによりさらに改良されることが期待される。
- ・ セルアレイが生産する多様な画像データを、さまざまな情報技術を用いて解析して、知識発見につながることを期待される。
- ・ より汎用的な細胞内ネットワーク解析ツールとしての実証を期待する。
- ・ セミナー等を通じて、プロジェクトの成果を広く紹介してほしい。開発された時系列解析技術について、適用するパスウェイの事例をさらに増やすなど当該技術の活用事例を増やし、成果を広く発信していくことが望まれる。
- ・ 具体的な応用例（成功例や失敗例も含む）をより多く紹介いただき、一般研究者がどのようにこの技術を活用すればよいかを明確にして欲しい。

2. 3 応用研究（臨床応用、創薬、機能性化粧品等）

1) 成果に関する評価

細胞アレイを用いたパスウェイ解析技術を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の同定と、高精度な治療効果予測システムの構築、既存薬の強化や併用を前提とした薬剤探索の方法論の開発、紫外線感受性遺伝子の探索による機能性化粧品開発への応用など、多数の有用な成果があがっており、十分に目標を達成している。この技術は、応用分野も今後広く、汎用性があると考ええる。

新たな発想の創薬、化粧品などの開発に役立つと期待できるので、今後は、パスウェイ解析手法の深化を目指し、このアプローチのノウハウを蓄積し、最終的にはバイオインダストリーのための大きなブレークスルーを狙って欲しい。

しかしながら、知財の取得が足りない。公的資金を用いて行った研究であるので、成果発信を積極的にしていただきたい。

〈肯定的意見〉

- 目標をクリアーしていると考ええる。新たな発想の創薬、化粧品などの開発に役立つと期待できる。
- 細胞アレイを用いたネットワーク解析によりパクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の同定、治療効果の予測、紫外線感受性に関わる遺伝子の同定などに成功しており、十分に目標を達成していると考えられる。得られた成果は、新たな技術領域を開拓する切り口となったと考えられる。今後、さらに研究を進めることにより得られた成果の重要性を明らかにしていく必要がある。
- ゲノム創薬における標的パスウェイ探索を効率的に行えるシステムが開発できた。
- パクリタキセル感受性遺伝子、紫外線感受性遺伝子が同定できることが示された。
- パスウェイ解析を用いた抗がん剤創薬や機能性化粧品の開発への可能性が示され評価できる。
- パスウェイ解析がプロジェクト全体として後半に達成されたため、短期間で難しい中、成果を出したことは評価できる。
- パクリタキセルの感受性診断に関しては、将来のパスウェイ解析の応用発展が見込まれる例として有意義である。応用分野も今後広く、パスウェイ解析の汎用性があると考ええる。

- 細胞アレイを用いたパスウェイ解析技術を応用した既存抗がん剤感受性遺伝子の同定と、高精度な治療効果予測システムの構築、既存薬の強化や併用を前提とした薬剤探索の方法論の開発、紫外線感受性遺伝子の探索による機能性化粧品開発への応用など、多数の有用な成果があがっている点が高く評価できる。
- 例示された応用例は極めて有用である。

〈問題点・改善すべき点〉

- 知財の取得が足りない。
- 知的財産の獲得については、さらなる検討が必要かもしれない。
- パスウェイ解析をさらに緻密に進め、特許という形で成果となることを第一義とし、早急な応用は求めなくて良いのではないか。
- パスウェイ解析結果の現状からの安易な応用よりも、解析手法の深化を目指し、このアプローチのノウハウ蓄積および特許化をまず目指し、最終的にはバイオインダストリーのための大きなブレークスルーを狙ってほしい。
- 企業が行っていた研究であるため限界があるかもしれないが、公的資金を用いて行った研究であるので、成果発信を積極的にしていただきたい。特に、カネボウについては、原著論文の発表が1報もない（研究分担額はいくらだったのか？）。

2) 実用化の見通しに関する評価

細胞アレイ解析は、マイクロアレイだけではできなかった抗がん剤感受性遺伝子の同定や患者細胞の表現型の解析等を可能にし、本技術の有用性を明確にした。また、薬剤耐性（トリプルネガティブ）遺伝子についての知見が深まったことから、将来的な薬剤が生まれる可能性がある。従って、その成果は日本発の創薬アプローチの可能性が示され、中長期的な創薬開発の要素技術として新たな商品開発に大いに役立つと考えられる。

しかしながら、セルアレイで同定した遺伝子群が、本当に創薬のターゲットとなりうるかの詳細な研究がまだ行われていない。今後、得られた遺伝子の解析を進めることにより、実用化に繋がるかどうかを明らかにすることが期待される。患者検体から培養した癌細胞を用いて、さらに研究を継続することを期待する。また、今後さらに薬剤耐性遺伝子を siRNA で抑えて薬剤を適用するなど、バイオ医薬を視野に入れたシナジーのある創薬を進めてほしい。

〈肯定的意見〉

- 実用化のイメージは明確であり、その成果は新たな商品開発に大いに役立つと考えられる。
- 得られた遺伝子の解析をすすめることにより、実用化につながるかどうかを明らかにすることが期待される。簡単なテーマではないので、できれば患者検体から培養した癌細胞を用いて、さらに研究を継続することを期待する。
- パクリタキセル感受性遺伝子、紫外線感受性遺伝子をセルアレイを用いて、同定できたことはプロジェクトの大きな成果である。
- セルアレイをもちいることによって、マイクロアレイだけでは同定できなかったような感受性遺伝子を見つけることができたことは大きな成果である。
- セルアレイ技術の有用性は高まった。
- 患者さんの細胞の表現型をセルアレイで解析できることを示したことは、臨床応用の可能性を大きく広げた。
- 日本発の創薬アプローチの可能性が示され、中長期的な創薬開発の要素技術として期待できる。
- 薬剤耐性（トリプルネガティブ）遺伝子についての知見が深まったことから、将来的な薬剤が生まれる可能性がある。
- 薬剤耐性関連遺伝子に関しても、特許化を検討するべきではないか。

- 抗がん剤感受性遺伝子を同定するとともに、新規に乳がんの培養細胞株を樹立し、同定された遺伝子の検証に成功していることなど、実用化に向けての取り組みが高く評価できる。本技術の有用性が明確である。

〈問題点・改善すべき点〉

- セルアレイで同定した遺伝子群が、本当に創薬のターゲットとなりうるかの詳細な研究がまだ行われていないようである。臨床で用いられるレベルと考えてよいのだろうか。
- 今後さらに薬剤耐性遺伝子を **siRNA** で抑えて薬剤を適用するなど、バイオ医薬を視野に入れたシナジーのある創薬を進めてほしい。

〈その他の意見〉

- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するかについては、不明。

3) 今後に対する提言

セルアレイで同定した遺伝子群が本当に創薬の対象となりうるのかどうか、さらなる検証を行って欲しい。その検証によって、実用化の成否が決まるであろう。応用研究の成果は、医学だけでなく、基礎の生物学の研究に利用できると考えられるので、関連学会等で広く発信していくことが望まれる。具体的成果として新たながん治療薬、機能性化粧品の上市を期待する。

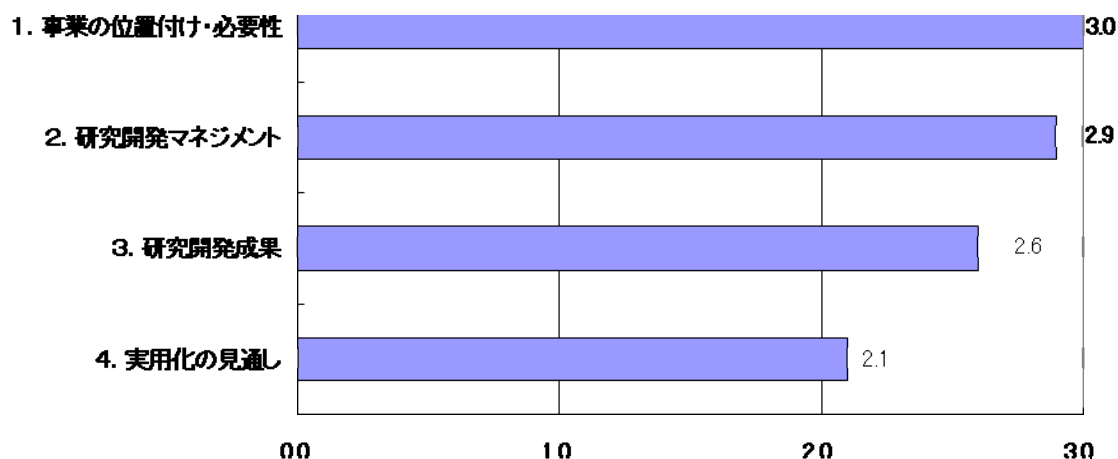
また、新たに樹立した乳癌細胞が癌幹細胞をどのくらい多く含んでいるか等の検討も期待したい。神経膠腫以外の癌幹細胞の培養はほとんどうまくいっていないので、癌幹細胞の研究に使用できれば大変興味深い。癌幹細胞が減少しないような培養条件の工夫を期待したい。

〈今後に対する提言〉

- ・ 具体的成果として新たながん治療薬、機能性化粧品を上市して頂きたい。
- ・ 新たに樹立した乳癌細胞が癌幹細胞をどのくらい多く含んでいるか等の検討も期待したい。神経膠腫以外の癌幹細胞の培養はほとんどうまくいっていないので、癌幹細胞の研究に使用できれば大変興味深い。癌幹細胞が減少しないような培養条件の工夫を期待したい。
- ・ セルアレイで同定した遺伝子群が本当に創薬の対象となりうるのかどうか、さらなる検証を行って欲しい。その検証によって、実用化の成否が決まるであろう。
- ・ 研究効率を高めるシステムとして、発展させることができれば、医学だけでなく、基礎の生物学の研究に利用できると考えられる。
- ・ さらに詳しいパスウェイ解析を進め、ブレークスルーを目指してほしい。
- ・ 応用研究の成果を、関連学会等で広く発信していくことが望まれる。(本技術の活用法について、積極的に広めてもらいたい。

3. 評点結果

3. 1 プロジェクト全体



評価項目	平均値	素点 (注)							
		A	A	A	A	A	A	A	A
1. 事業の位置付け・必要性について	3.0	A	A	A	A	A	A	A	A
2. 研究開発マネジメントについて	2.9	A	A	A	A	B	A	A	A
3. 研究開発成果について	2.6	B	A	A	A	B	A	B	B
4. 実用化の見通しについて	2.1	B	A	B	B	B	A	C	C

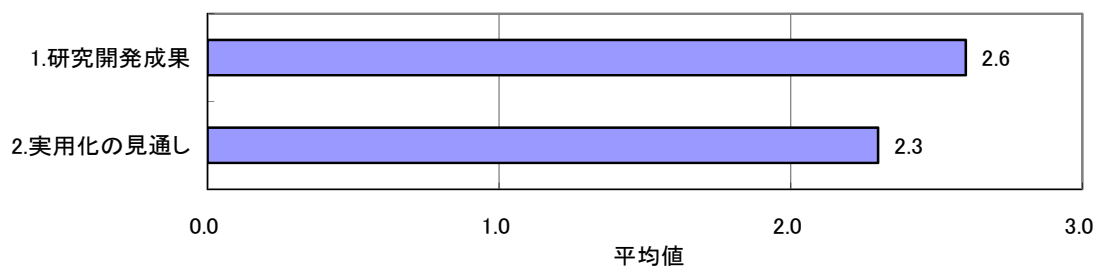
(注) A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

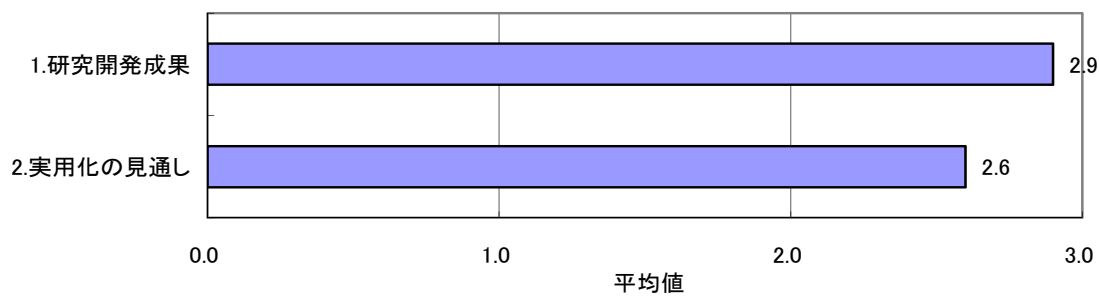
1. 事業の位置付け・必要性について	3. 研究開発成果について
・非常に重要 →A	・非常によい →A
・重要 →B	・よい →B
・概ね妥当 →C	・概ね妥当 →C
・妥当性がない、又は失われた →D	・妥当とはいえない →D
2. 研究開発マネジメントについて	4. 実用化の見通しについて
・非常によい →A	・明確 →A
・よい →B	・妥当 →B
・概ね適切 →C	・概ね妥当であるが、課題あり →C
・適切とはいえない →D	・見通しが不明 →D

3. 2 個別テーマ

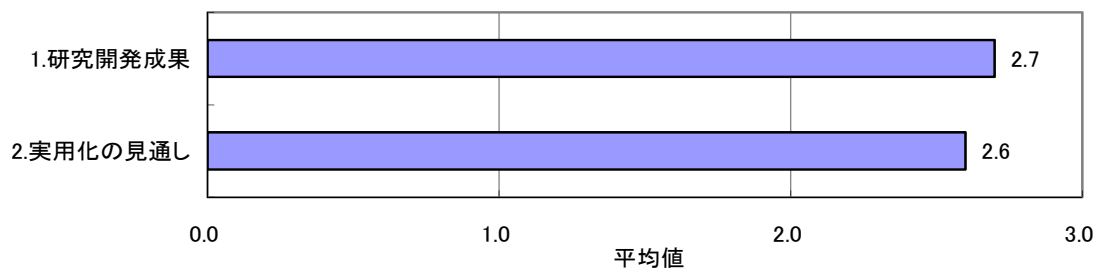
3. 2. 1 デバイス・ハイスループット関連技術開発



3. 2. 2 時系列測定技術開発



3. 2. 3 応用研究（臨床応用、創薬、機能性化粧品等）



個別テーマ名と評価項目	平均値	素点（注）							
3. 2. 1 デバイス・ハイスループット関連技術開発									
1. 研究開発成果について	2.6	B	A	A	A	A	A	A	C
2. 実用化の見通しについて	2.3	B	A	B	B	A	A	A	C
3. 2. 2 時系列測定技術開発									
1. 研究開発成果について	2.9	A	A	A	A	B	A	A	A
2. 実用化の見通しについて	2.6	A	A	A	B	B	A	A	B
3. 2. 3 応用研究（臨床応用、創薬、機能性化粧品等）									
1. 研究開発成果について	2.7	B	A	A	A	B	A	A	A
2. 実用化の見通しについて	2.6	A	A	B	A	B	A	A	B

（注）A=3, B=2, C=1, D=0 として事務局が数値に換算し、平均値を算出。

〈判定基準〉

1. 研究開発成果について

- ・非常によい
- ・よい
- ・概ね適切
- ・適切とはいえない

2. 実用化の見通しについて

- A ・明確
- B ・妥当
- C ・概ね妥当であるが、課題あり
- D ・見通しが不明

第2章 評価対象プロジェクト

1. 事業原簿

次ページより、当該事業の事業原簿を示す。

「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 - 1 0	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 1 7 年度～平成 2 1 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变化が期待でき、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

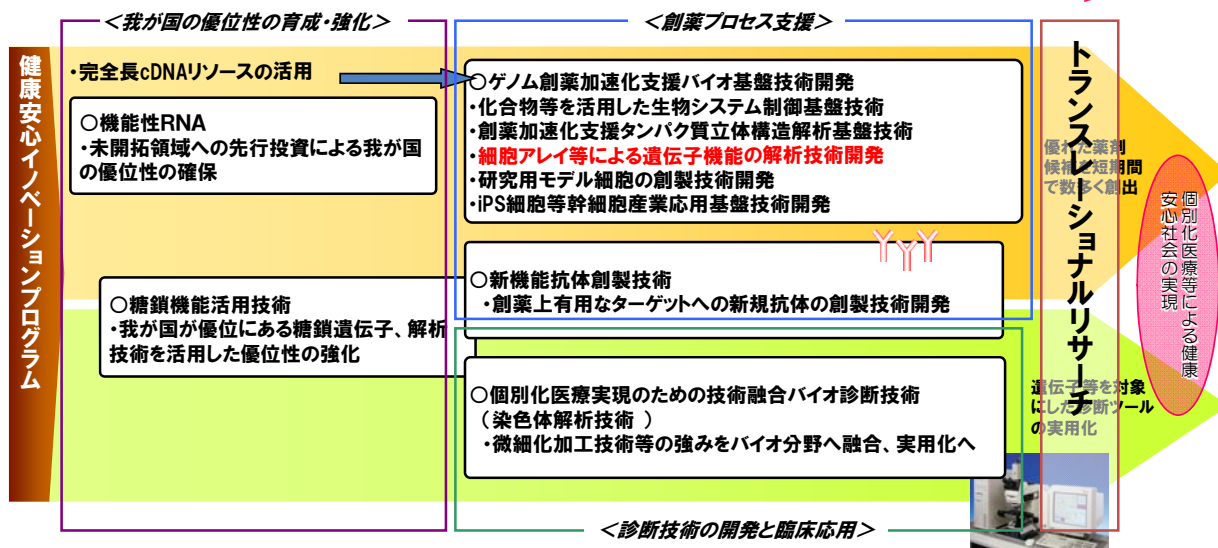
本研究開発は、遺伝子やタンパク質等の生体分子の機能・構造解析等を行うとともに、それらの研究を強力に推進するためのバイオツールやバイオインフォマティクスの開発、成果を高度に利用するためのデータベース整備や先端技術を応用した高度医療機器開発等により、テーラーメイド医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーション」プログラムの一環として実施する。

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。

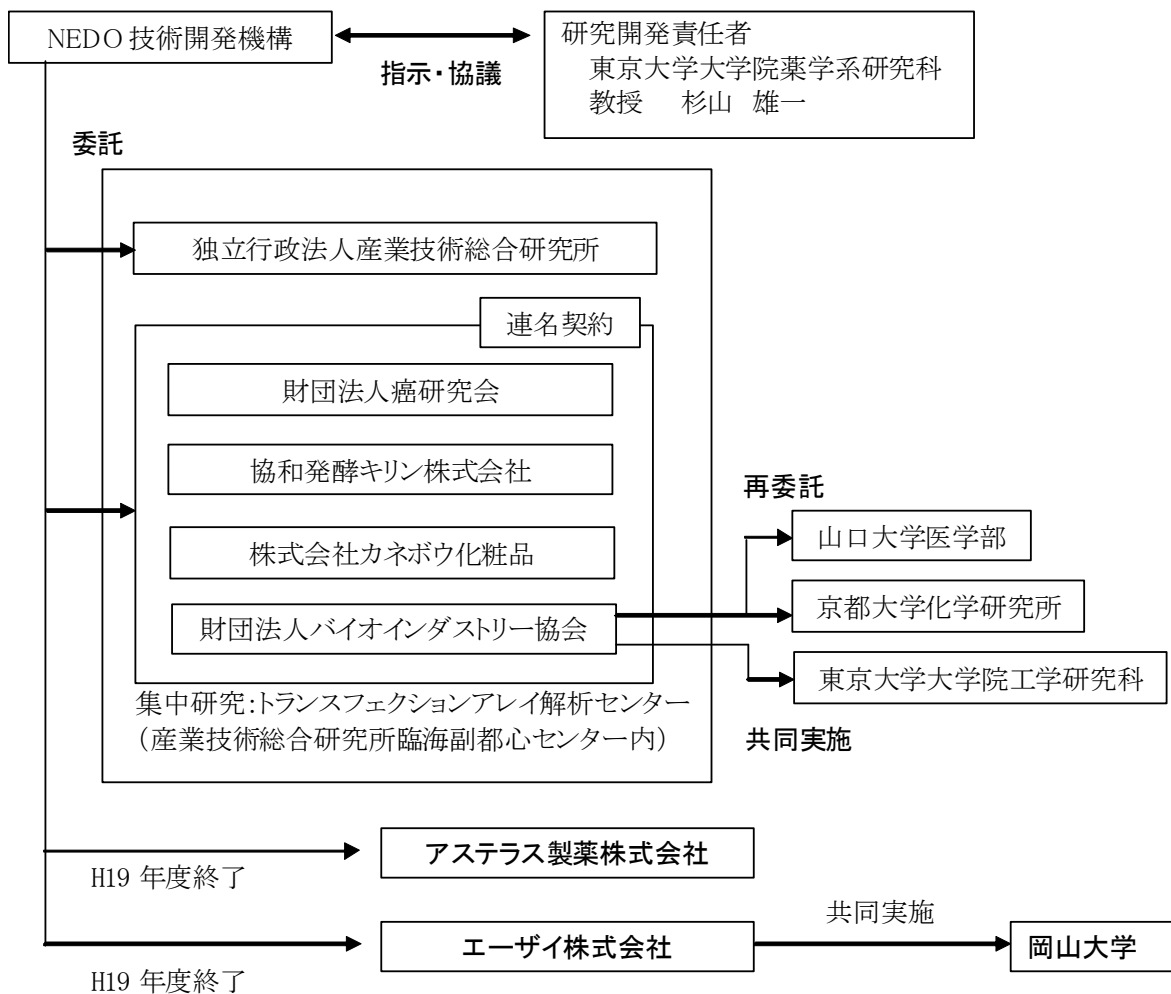
2.2 研究開発の実施体制

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

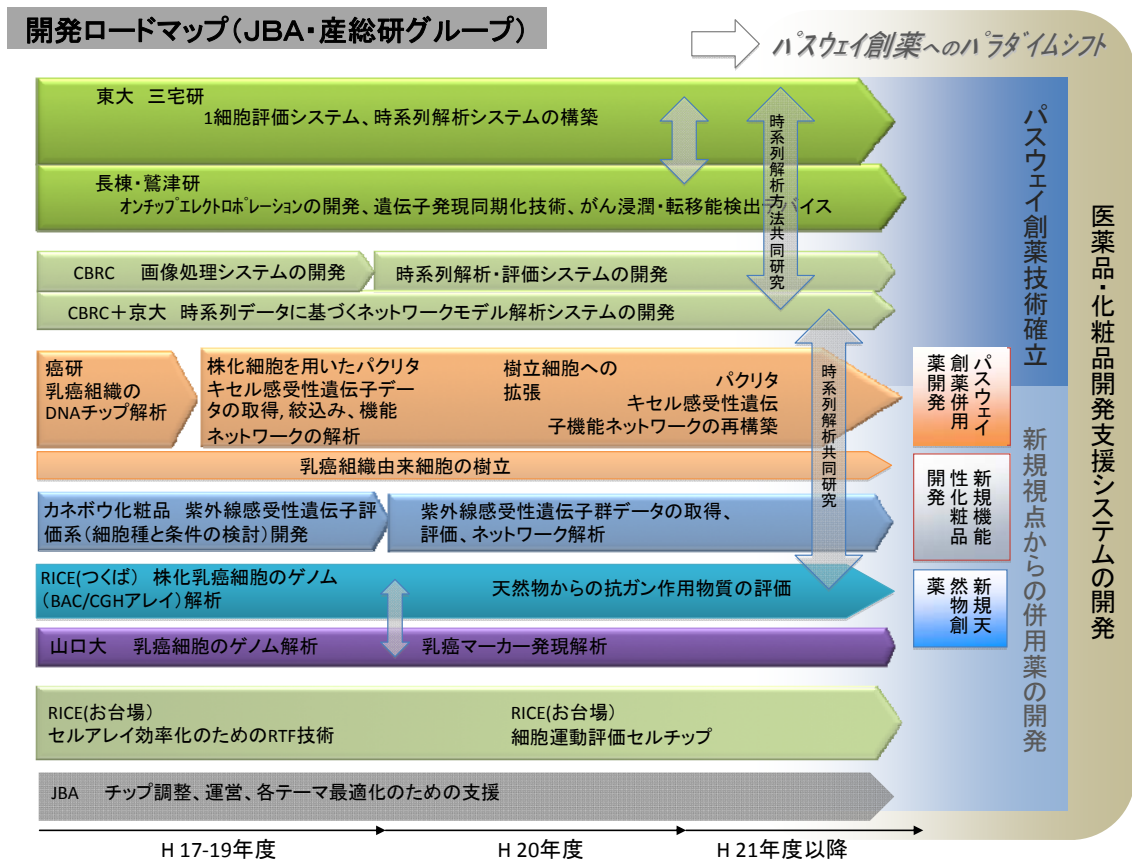
その他運営管理

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事が可能となった。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>○</p>
<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>	<p>◎</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り込み
- ・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け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によって起こる。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。

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年間において、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”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よって行われ、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

ないと言うことである。

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

を樹立した後、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ータンパク質 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ウンドレベルの蛍光強度も強かったので、バックグラウ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)-d1Venus レポーター安定発現株細胞として実験に用いた。また、SRE レポーターについても同様に NIH3T3/SRE (N3)-d1Venus レポーター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。レポーター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、あたかもレポーター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ーとした 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、レポーター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 のレポーター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ー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、結局のところ、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進め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。

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

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。

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

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。

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

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。

$$OF_{SN} = \alpha OF_{RCGAs} + (1 - \alpha) C_{DE} \quad (12)$$

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。図から分かる通り、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。

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か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ど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-乳がんにのみ認められ、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リ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つ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 とともに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、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。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、鷲津研）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℃、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 μ l に溶解した。ローダミン液は、No-WeighTM Pre-Measured Rhodamine Protein Labeling Reagent に DMF を 100 μ l 加えて調整した。溶解したフィブロネクチン 100 μ l にローダミン液 10 μ l 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

4 μ l の DMEM で pCS-Venus(1 μ g/ μ l) 1 μ l および siRNA(10 μ M) 10.5 μ l を希釈した。希釈液に 2 μ l 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 μ g/ μ g)を 5 μ l さらに Type B ゼラチン (Sigma) を 5 μ l 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 TGF β 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、さらには標的に関連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無い。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、非小細胞肺がん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学的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。従来の遺伝子選定は、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100µm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、一晩乾燥。
- 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、一晩乾燥。
- 暗室にてスライドグラスを乳剤に浸し、4°C、暗箱中で一晩静置。
- 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。

<ウェスタンブロット解析>

- 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、モータリン細胞内分布変化、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 ProfilerTM) 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小さく、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 で扱われてきた新しい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(モントリオール大)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 μ m 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 Denariatz (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

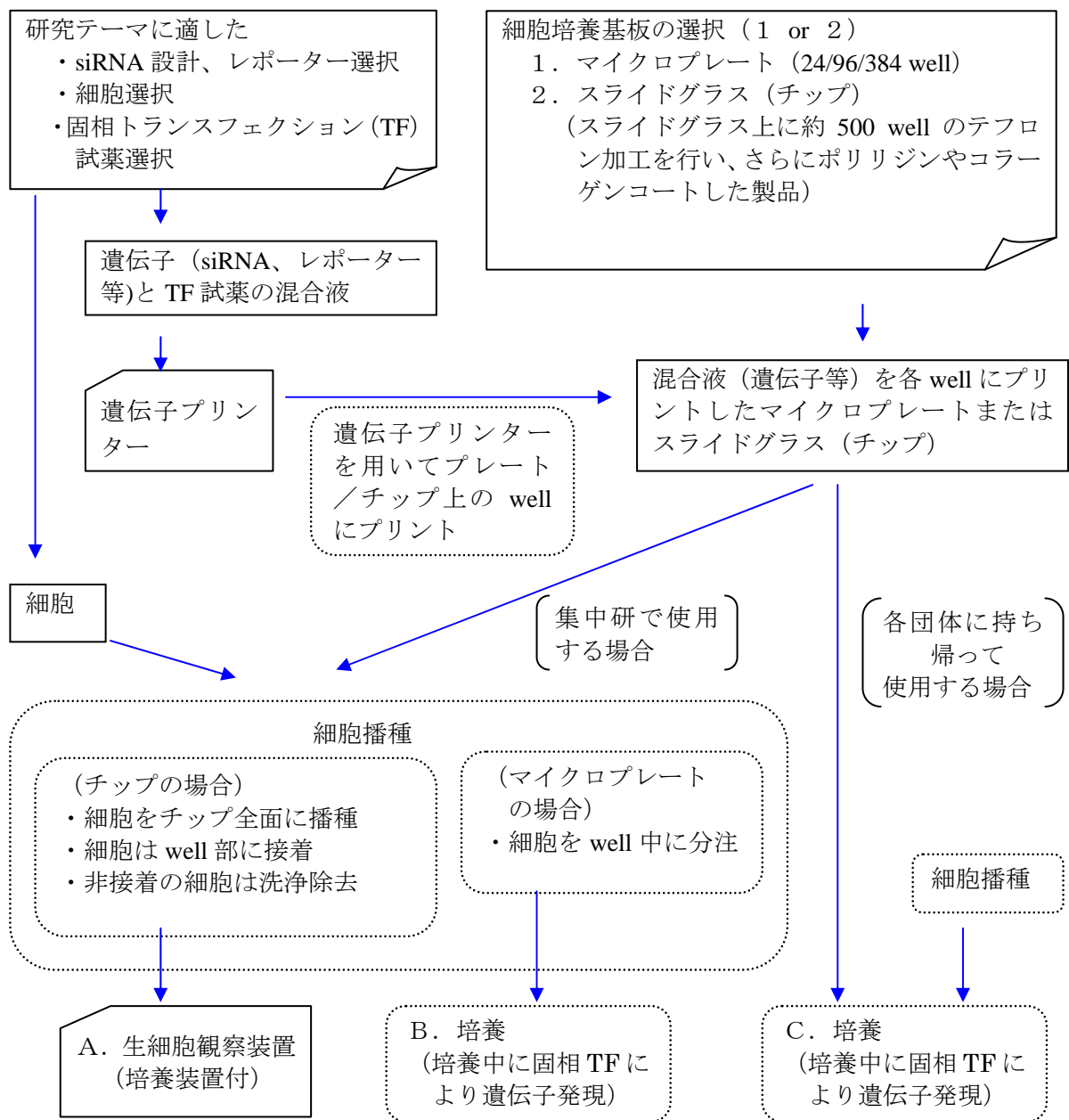
バイオインダストリー協会（JBA）は産業技術総合研究所（産総研）セルエンジニアリング研究部門（RICE）（臨海副都心センター本館）内に設置した集中研（JBA 分室）に解析用の共用システムを構築し、本事業に参加した団体および研究者の用に供した。また、JBA は共用システムの管理および運用（実験と解析支援等）を担当した。尚、これらの管理および運用は産総研 RICE の研究者の指導と協力を得て行ったものである。

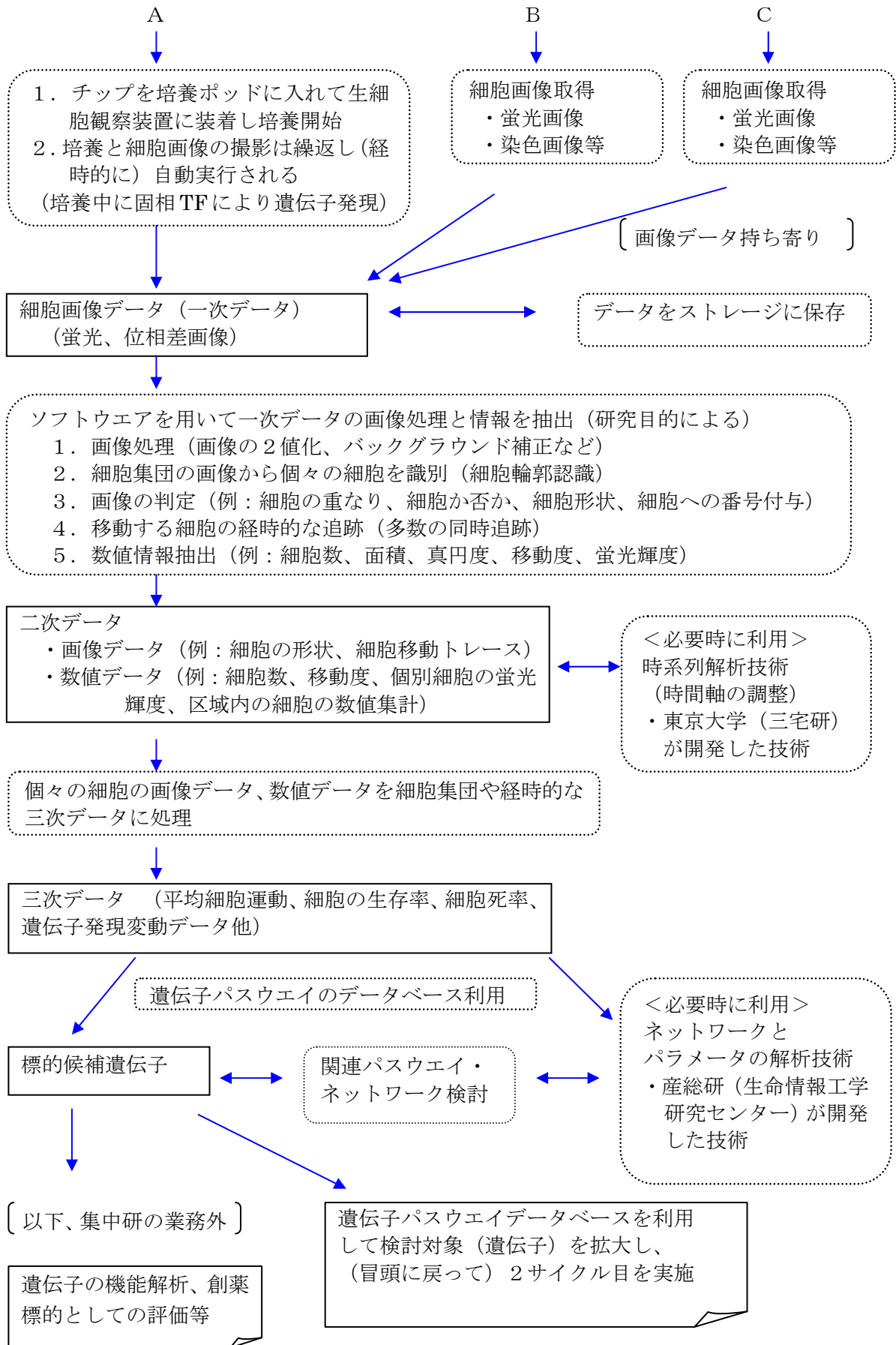
以下、共用システムの概要および運用実績を示す。

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 ウェルプレート）
- プリント精度：CV 値 20%以内



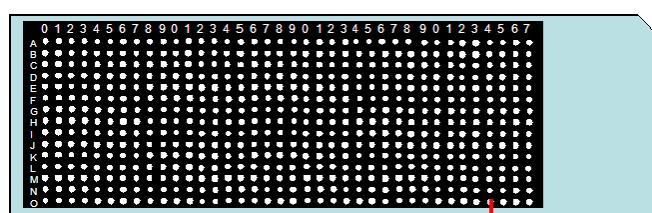
3) 細胞培養セル

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

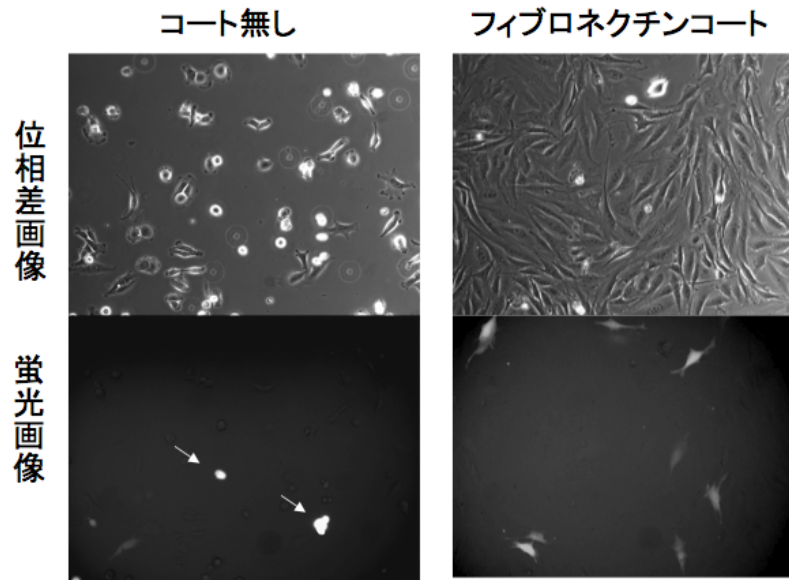
区分 年度	特許出願			論文、発表等		その他外部 発表（プレ ス発表等）
	国内	外国	PCT 出願	論文等	学会発表 講演	
H17～21FY	1 件	1 件	1 件	193 件	268 件	2 件

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

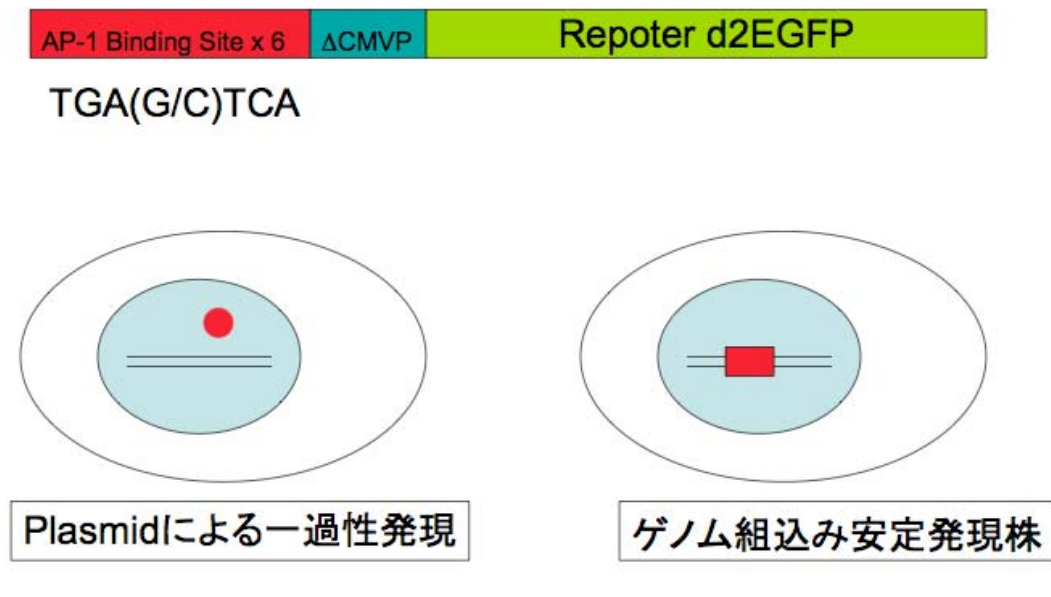
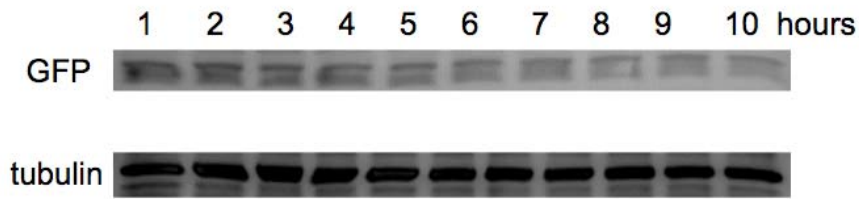


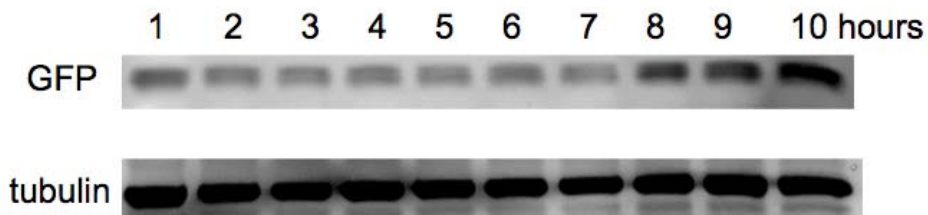
図 2(2)-2 transcrittion cis-element repotor 模式図



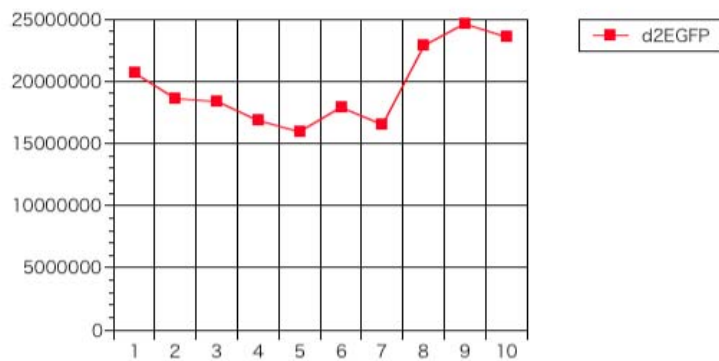
Transient Expression by Plasmid



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

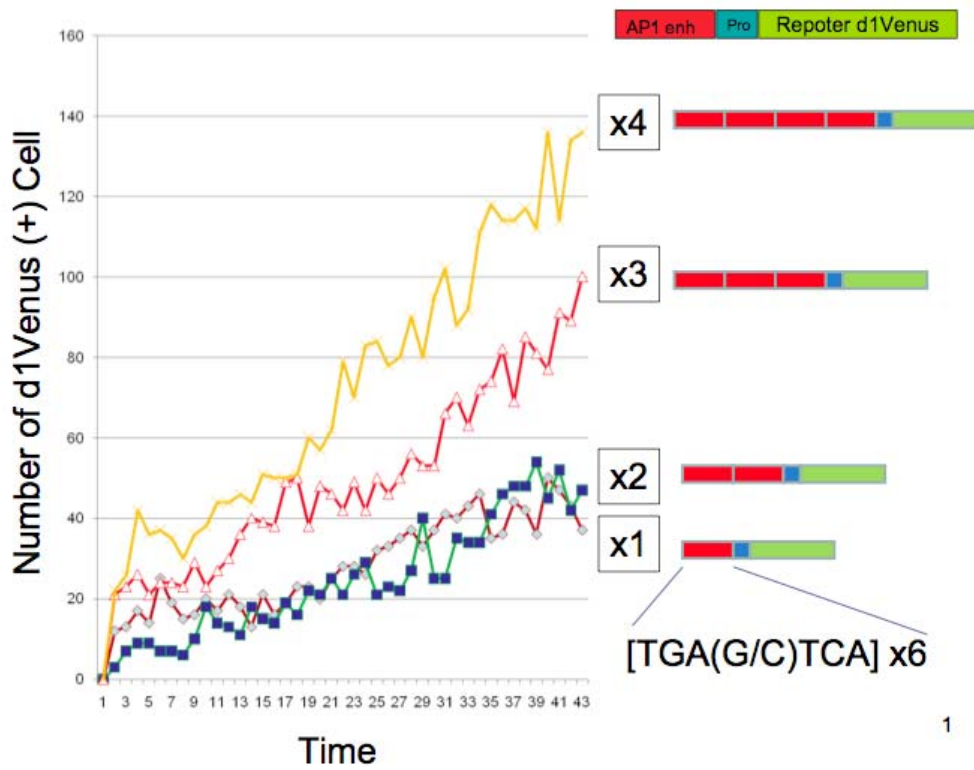


図 2(2)-4 多重連結 AP1 エンハンサーによる AP1-d1Venus レポーター応答性の改善 (NIH3T3)

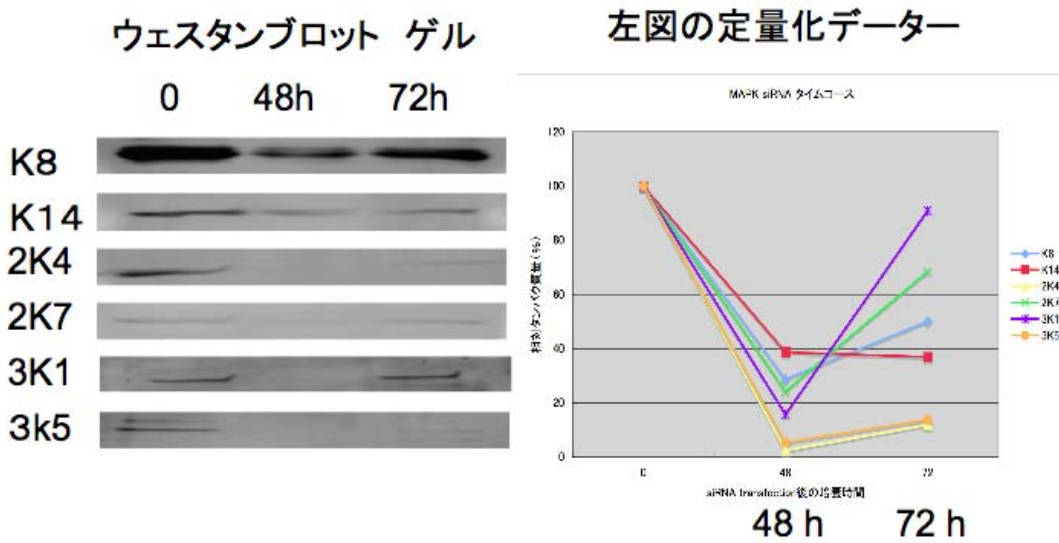
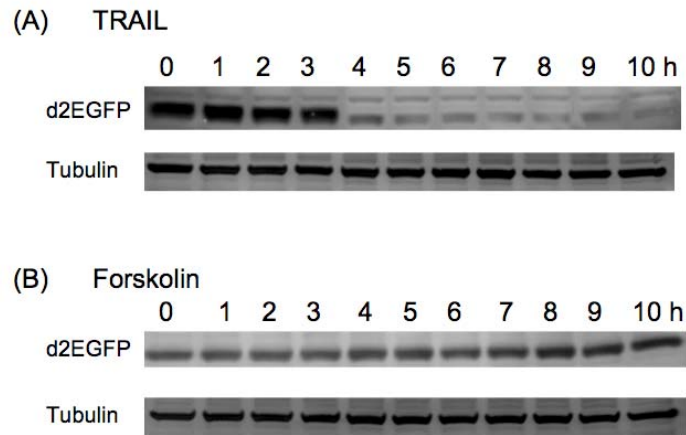
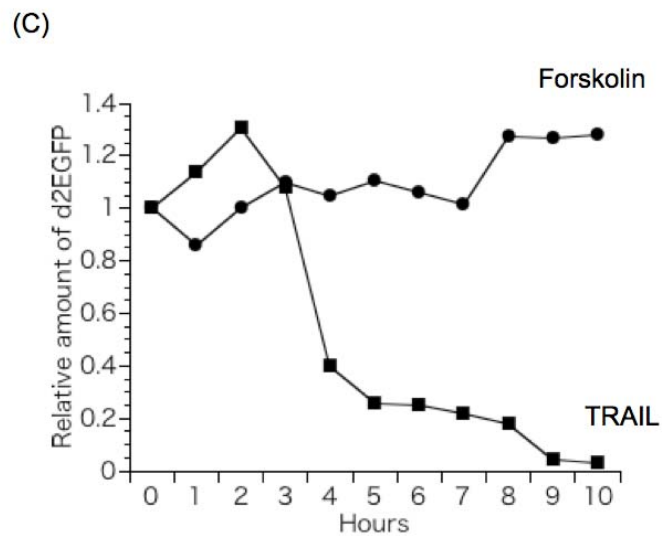


図 2(2)-5 siRNA による MAPK 発現抑制



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。



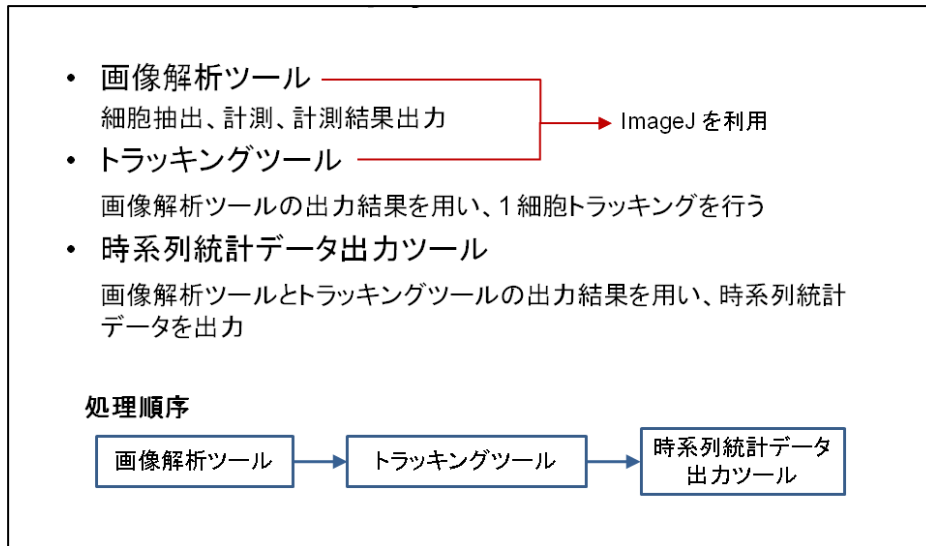
上のウエスタンブロットのバンドを定量化し、タイム 0 のバンドの強度を 1.0 として、相対値を取ってグラフ化した。TRAIL 刺激によってレポーター蛋白質 d2EGFP の量が、9 時間後には 10%以下になっている事が分かる。

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



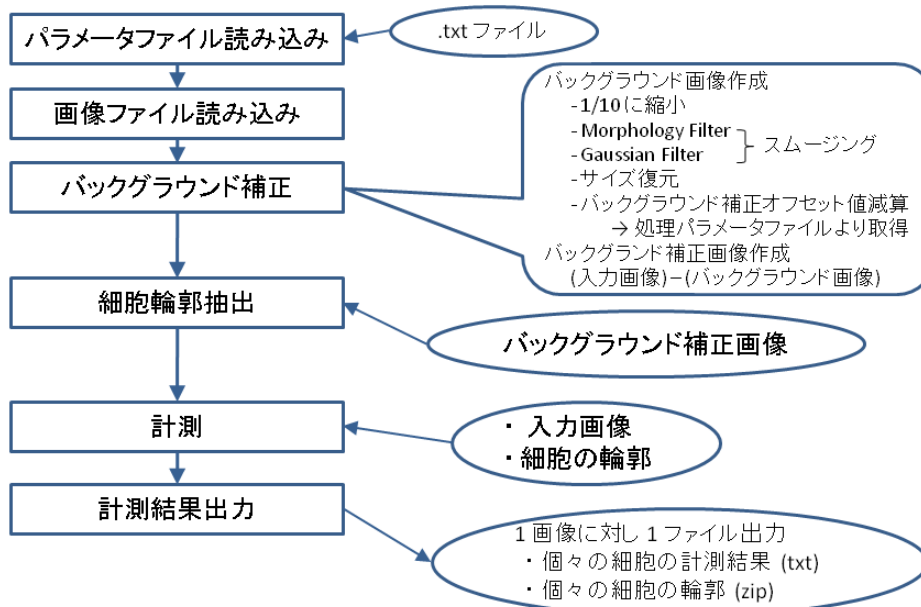
2(3)-1 B Image J

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

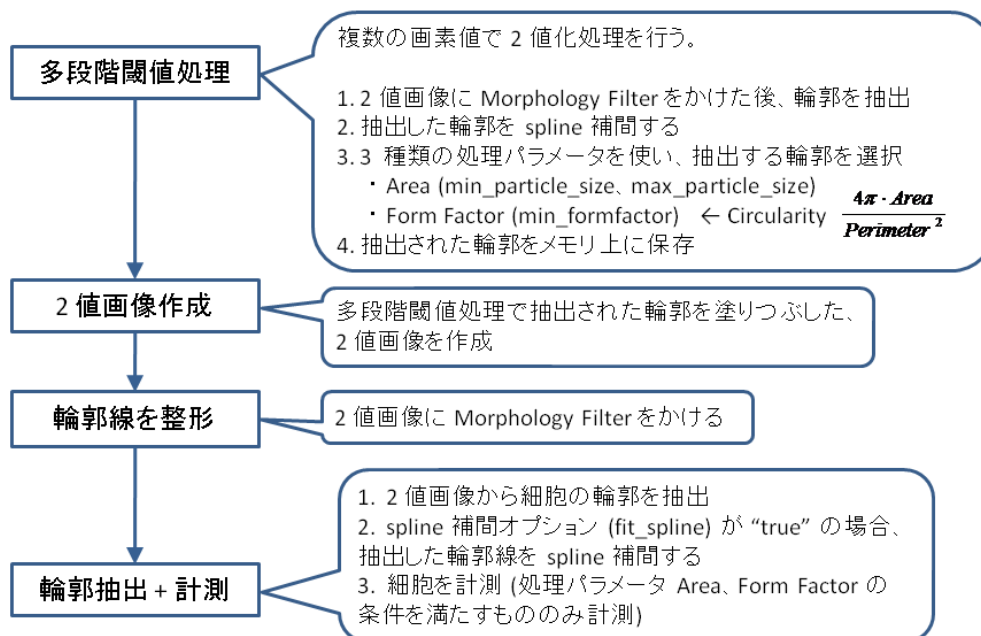
gaussian_blur_radius=2.0
rank_filter_radius=2.0
bilateral_spatial_radius=3.0
bilateral_range_radius=50.0

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

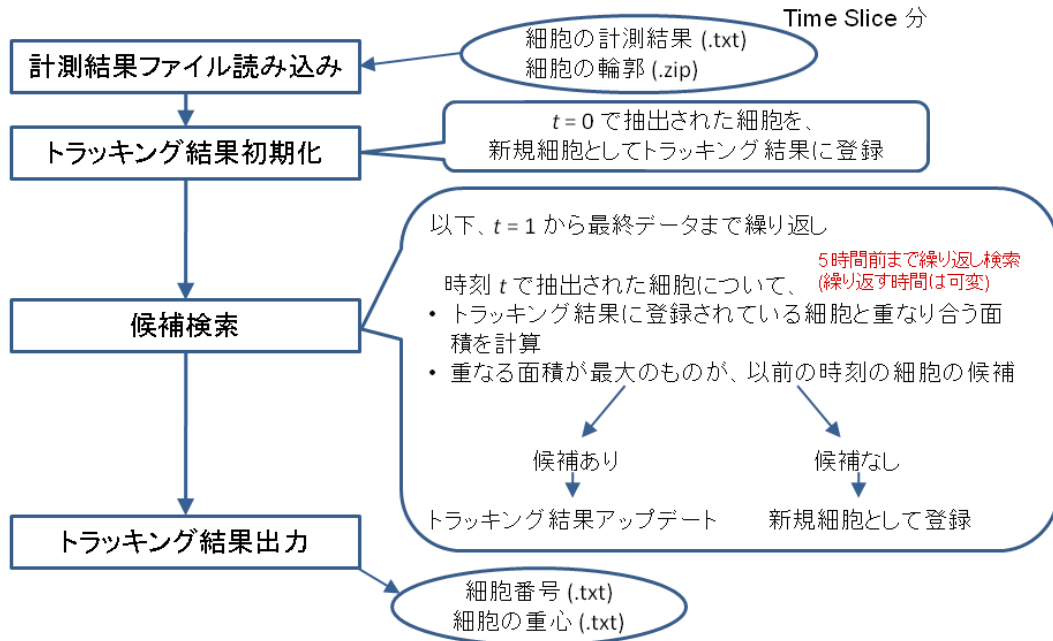
[Total Measurements]										
	Area	Total	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	X	Y	...
1	1376256	1.44E+08	104.784	9.471	103	0	189	672	512...	
[Cell Measurements]										
	Area	Total	Mean	StdDev	Mode	Min	Max	X	Y	...
1	820	92389	112.67	11.019	111	84	164	1135.322	226.384...	
2	1724	216746	125.723	11.659	125	76	160	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
8.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

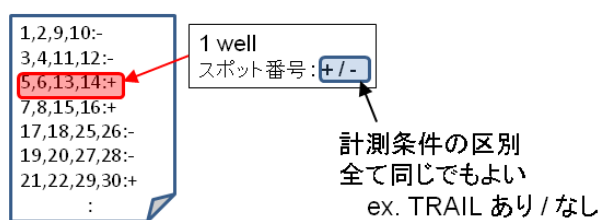
時系列統計データ出力ツール

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



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)

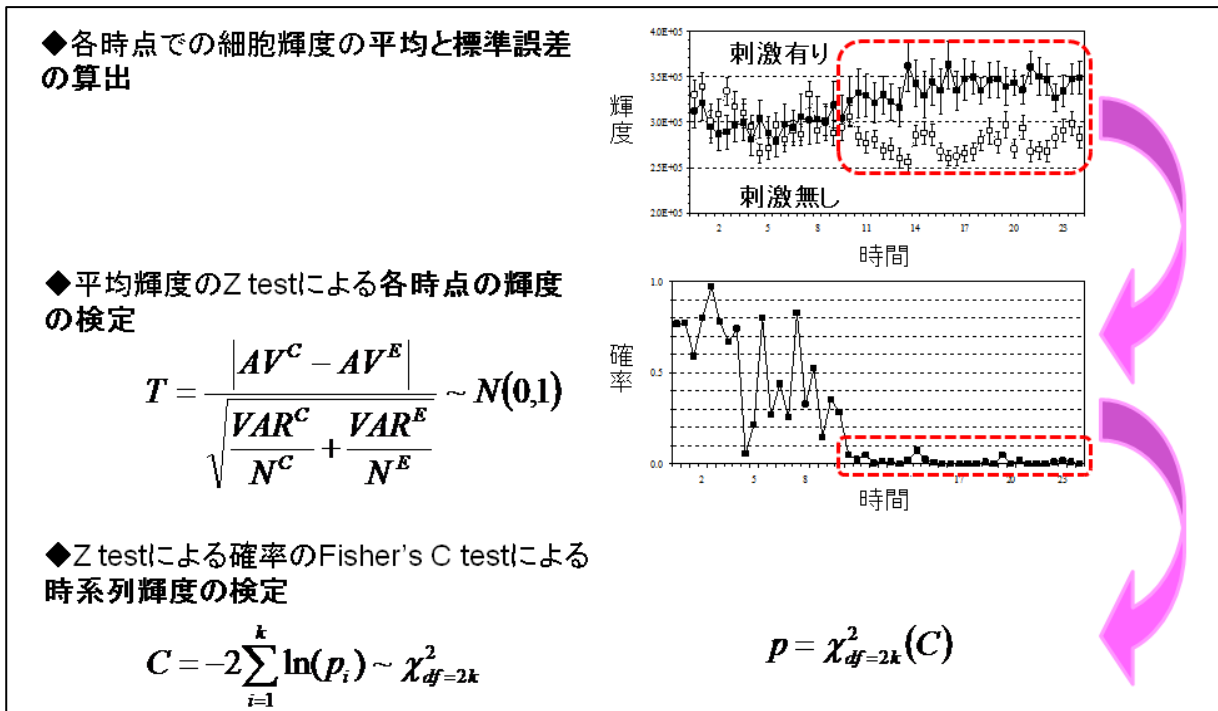


図 2(4)-1 時系列データ比較のための統計解析

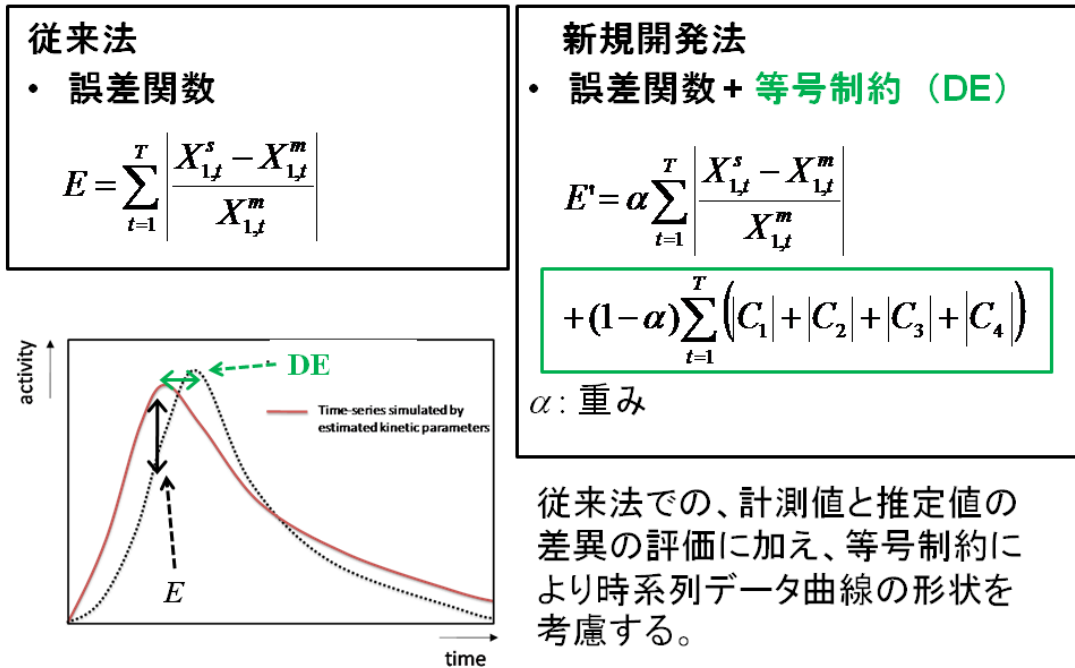


図 2(5)-1 新規パラメータ推定法の概略

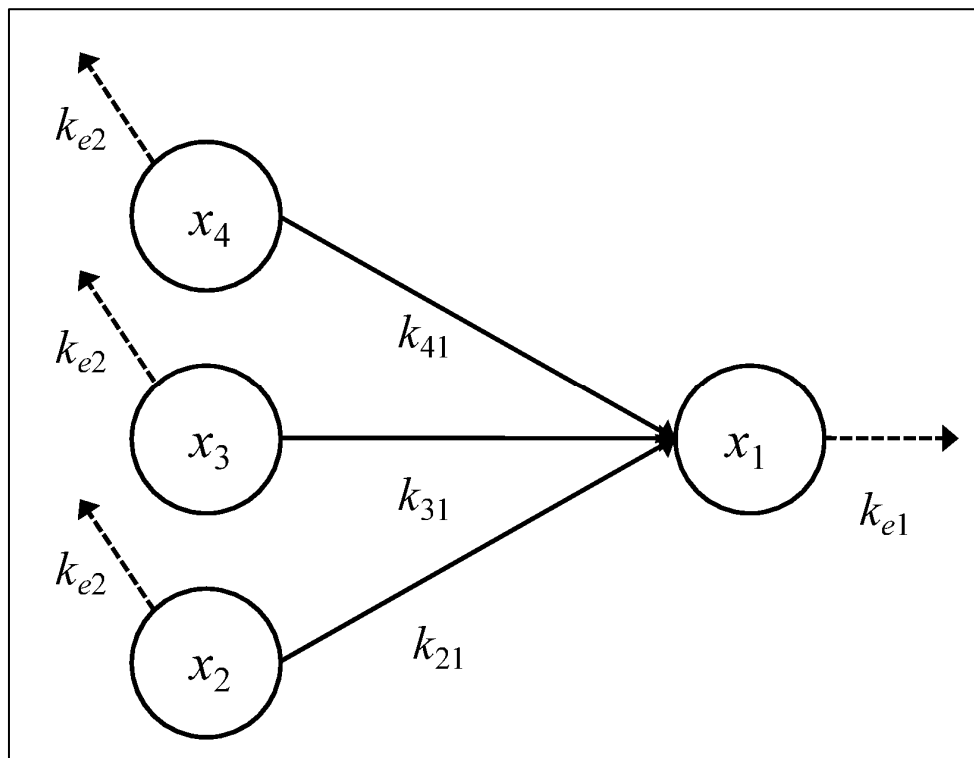


図 2(5)-2 モデル例

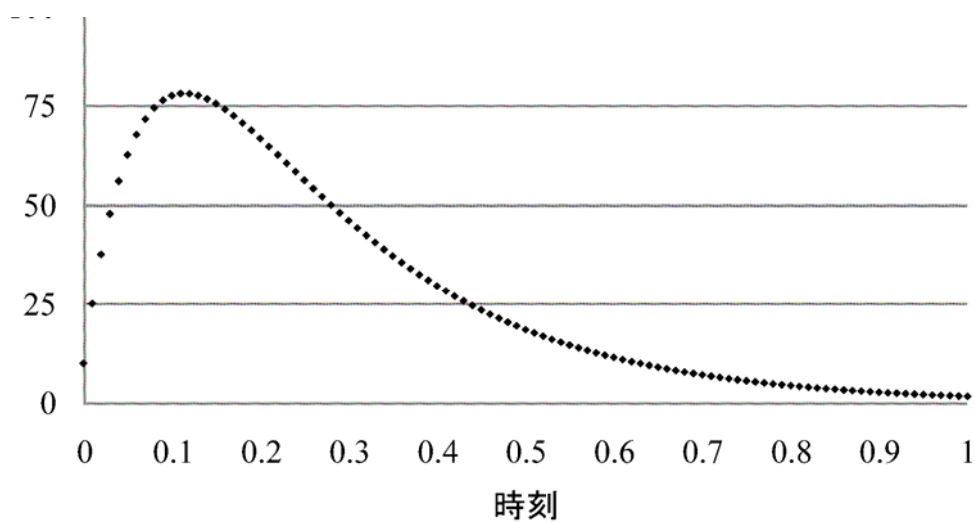


図 2(5)-3 図 2(5)-2 のモデルに基づき生成されたシミュレーション曲線

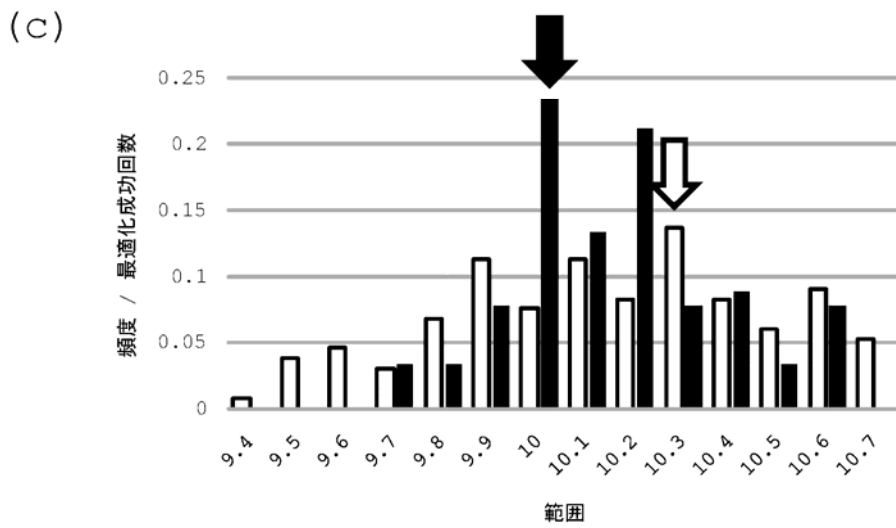
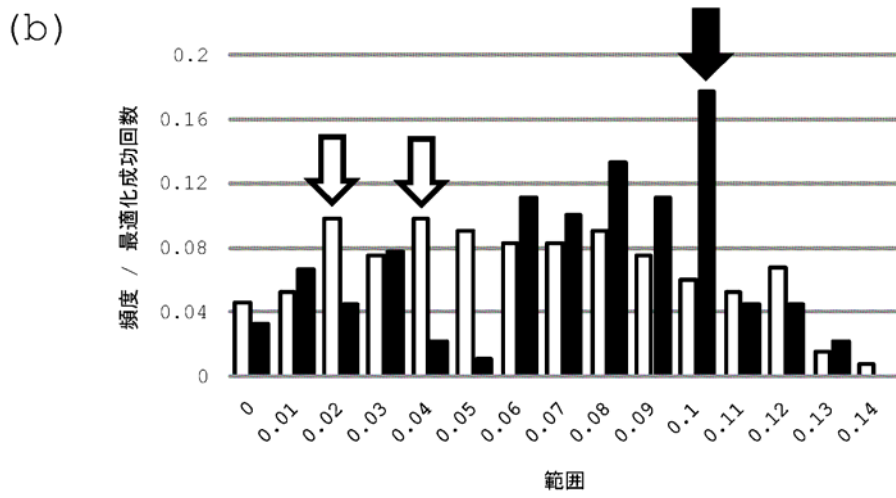
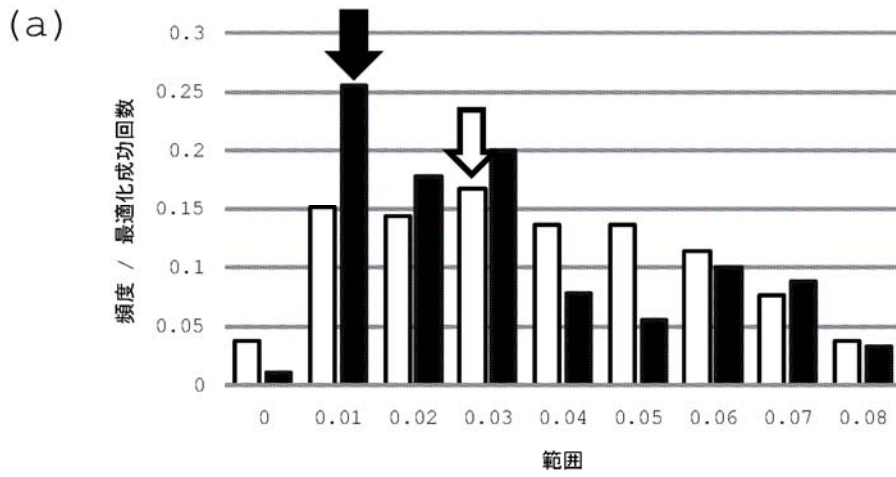


図 2(5)-4 パラメータ推定結果
 新規開発法及び従来法の推定値を黒及び白矢印で示す。

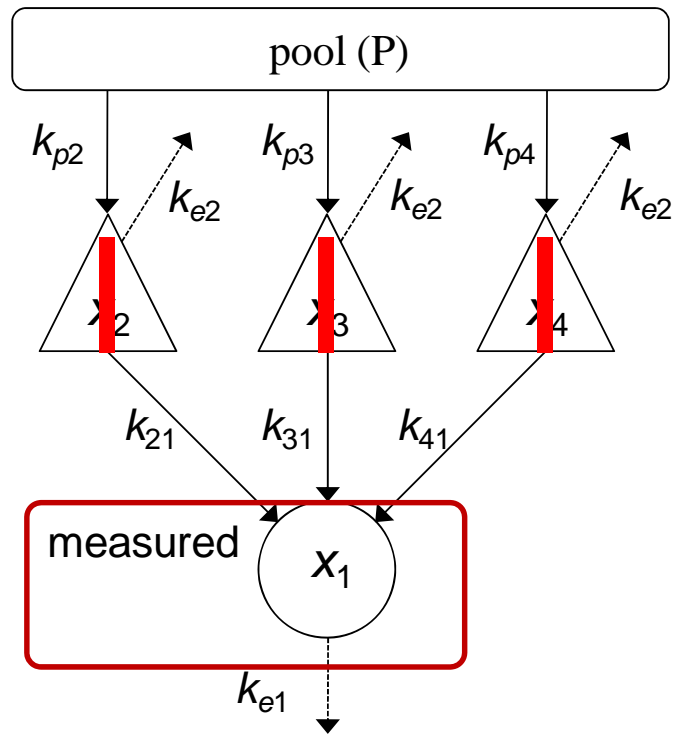


図 2(5)-5 実計測データを想定したモデル

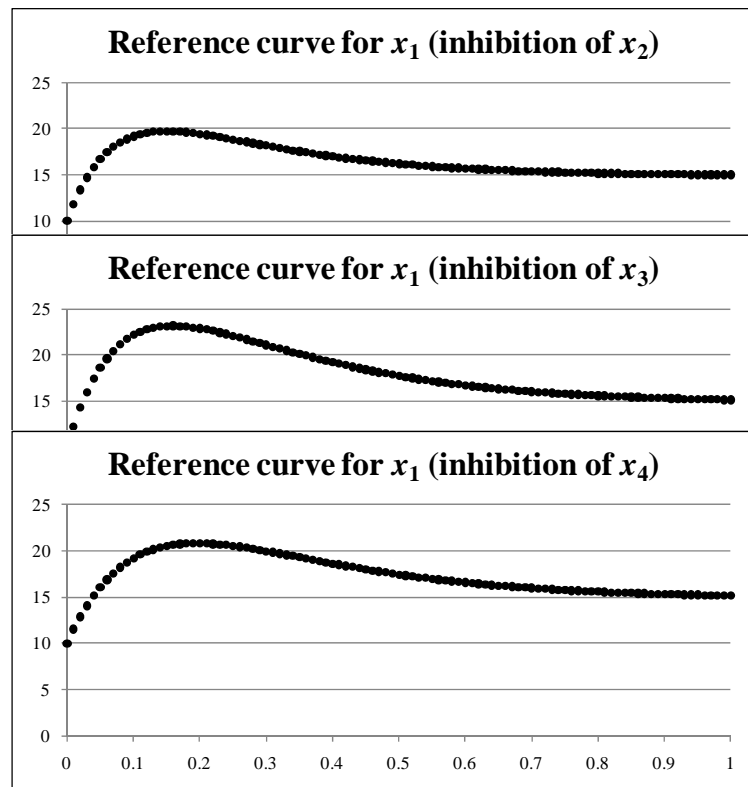
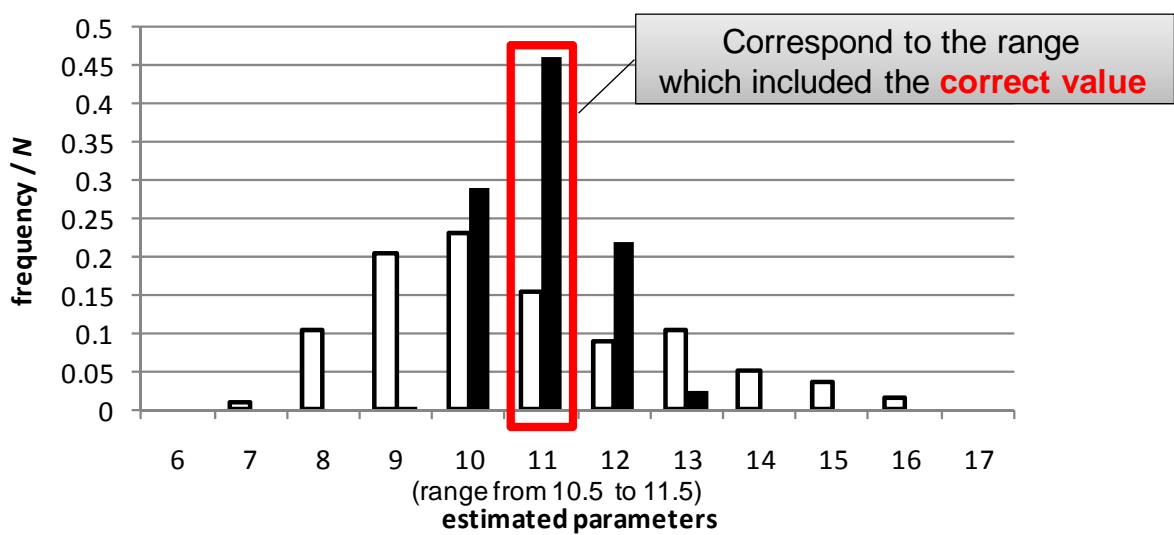
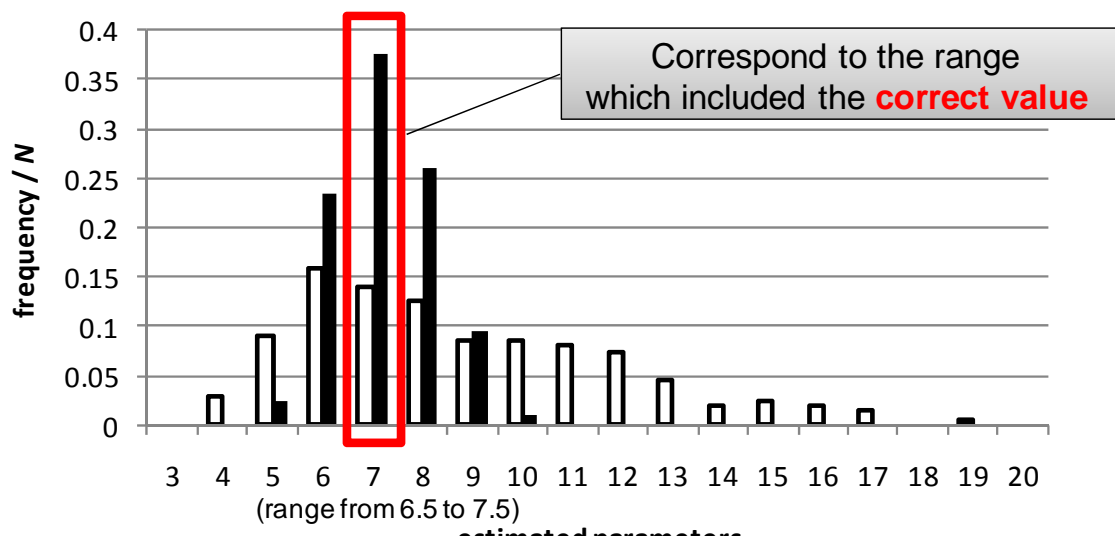
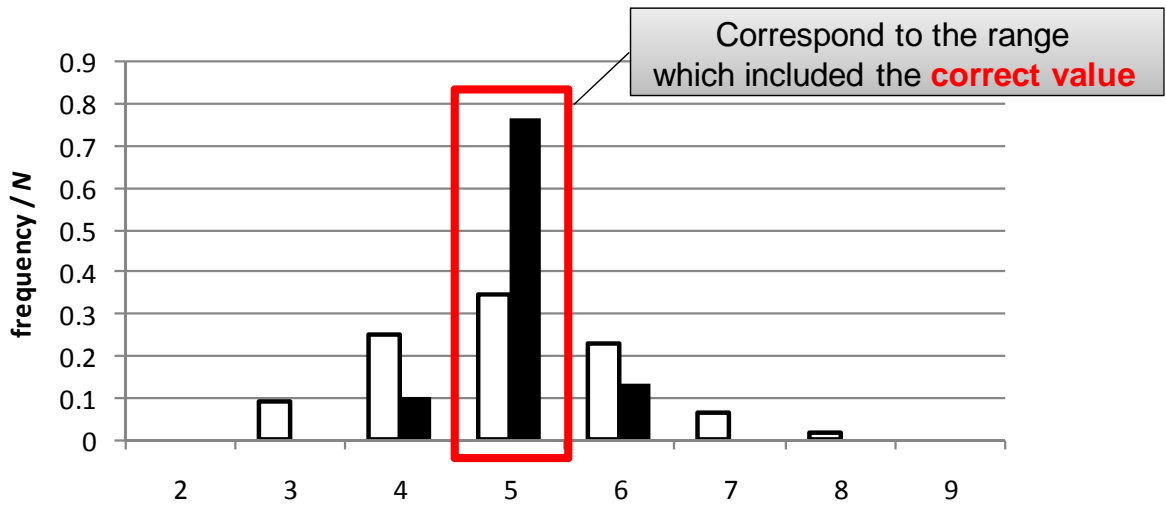


図 2(5)-6 図 2(5)-4 のモデルに基づき生成されたシミュレーション曲線



□ RCGAs ■ symbolic-numeric method

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)

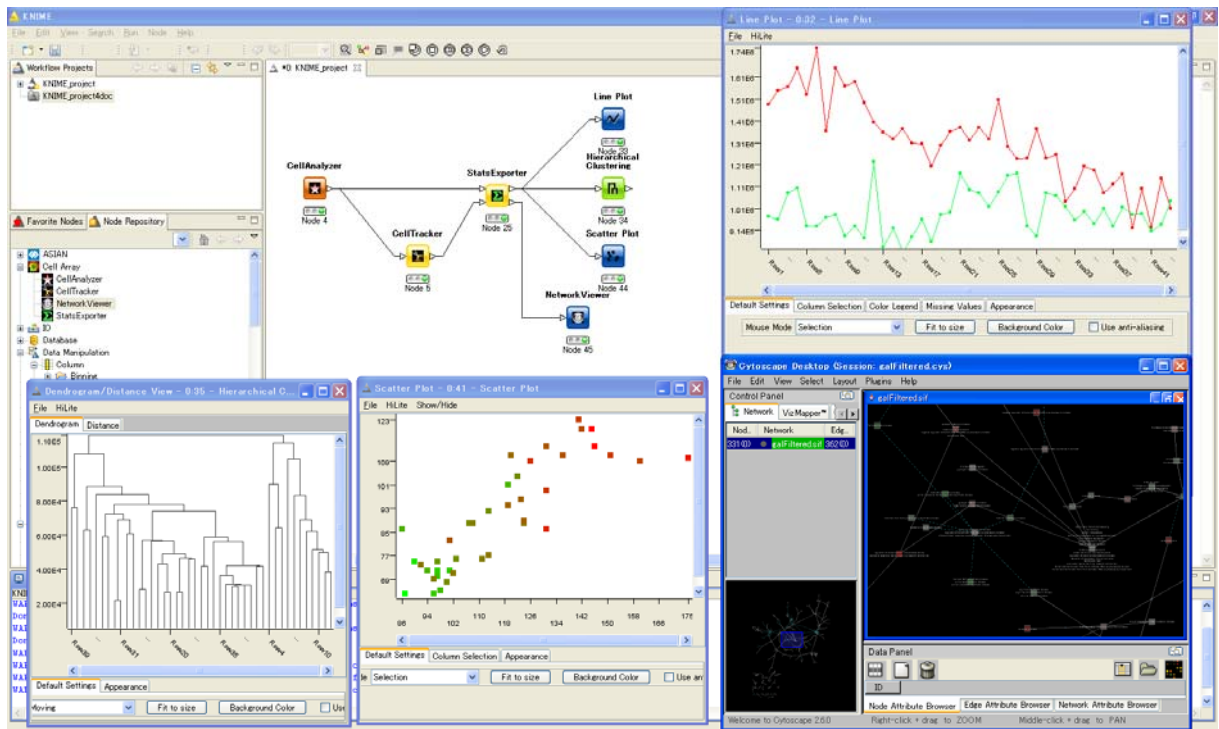


図 2(6)-1 Cell Array KNIME ワークフロー化

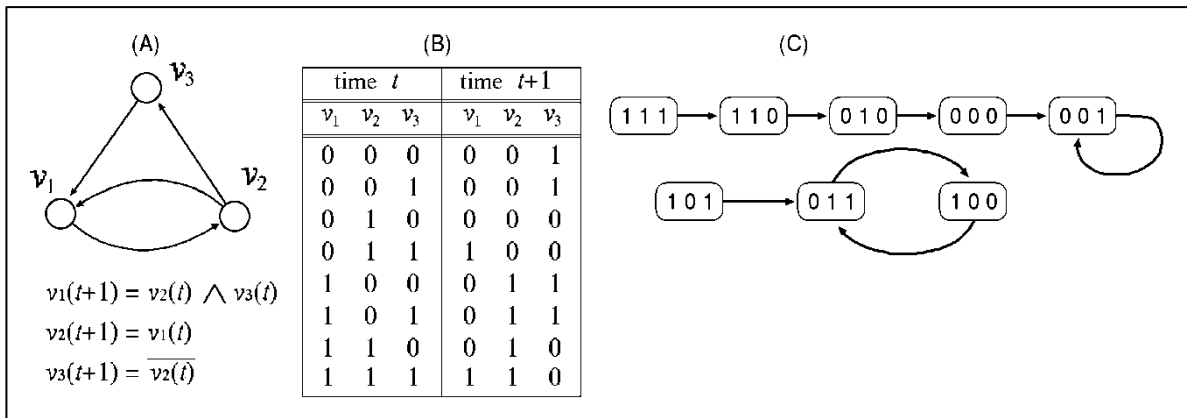


図 2(7)-1 ブーリアンネットワークの例 (A) と、それに対する状態遷移表 (B)、および、状態遷移ダイアグラム (C)。

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

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。

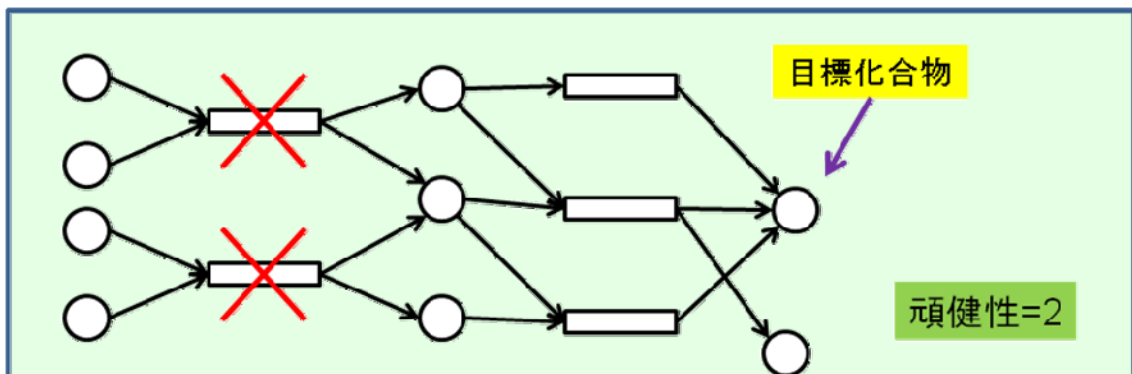


図 2(7)-3 代謝ネットワークの頑健性。この図では丸が化合物ノードを表し、長方形が化学反応ノードを表す。目標化合物を生成不能とするには赤い×印で示した2種類の反応を不活性化させる必要があるので頑健性が2となる。

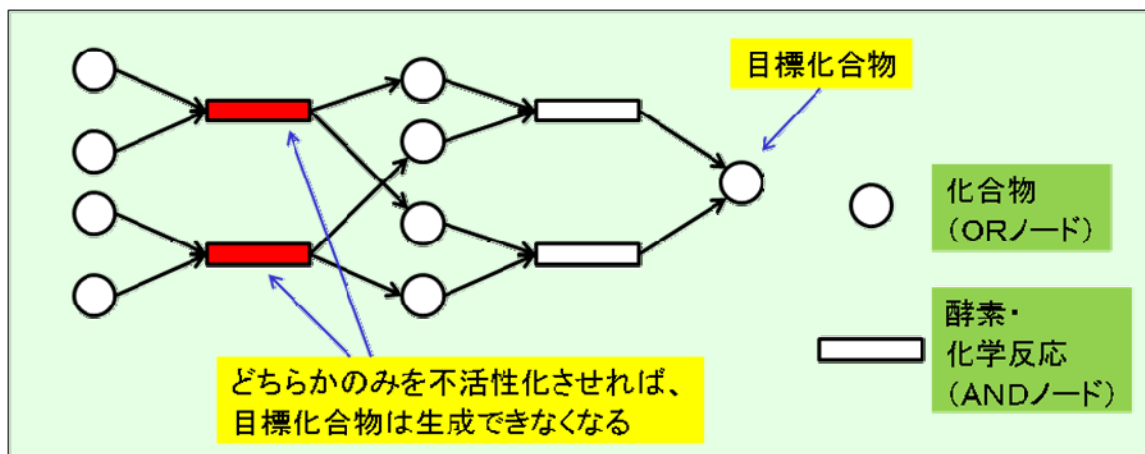


図 2(7)-4 代謝ネットワークのブーリアンネットワークによるモデル化。化合物は OR 頂点に対応し、化学反応（≒酵素）は AND 頂点に対応する。この図の場合には、赤で示した反応の一方のみを不活性化させれば、目標化合物が生成不可能となる。

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

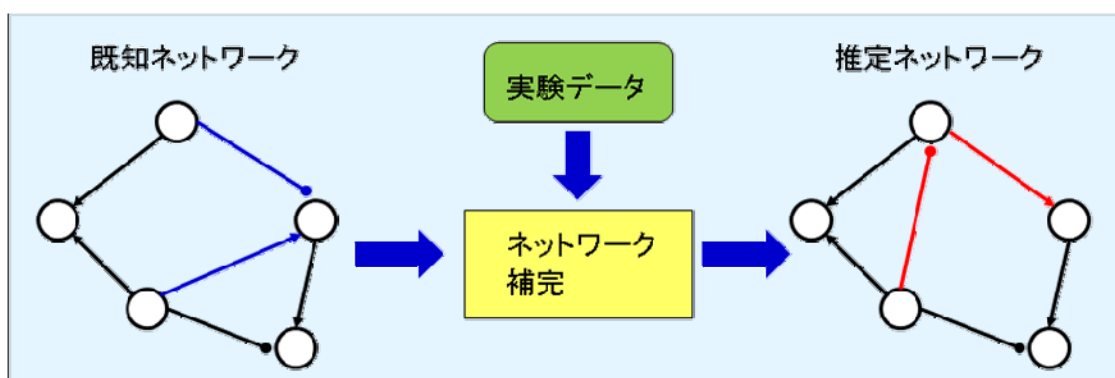


図 2(7)-5 ネットワーク補完（概念図）。

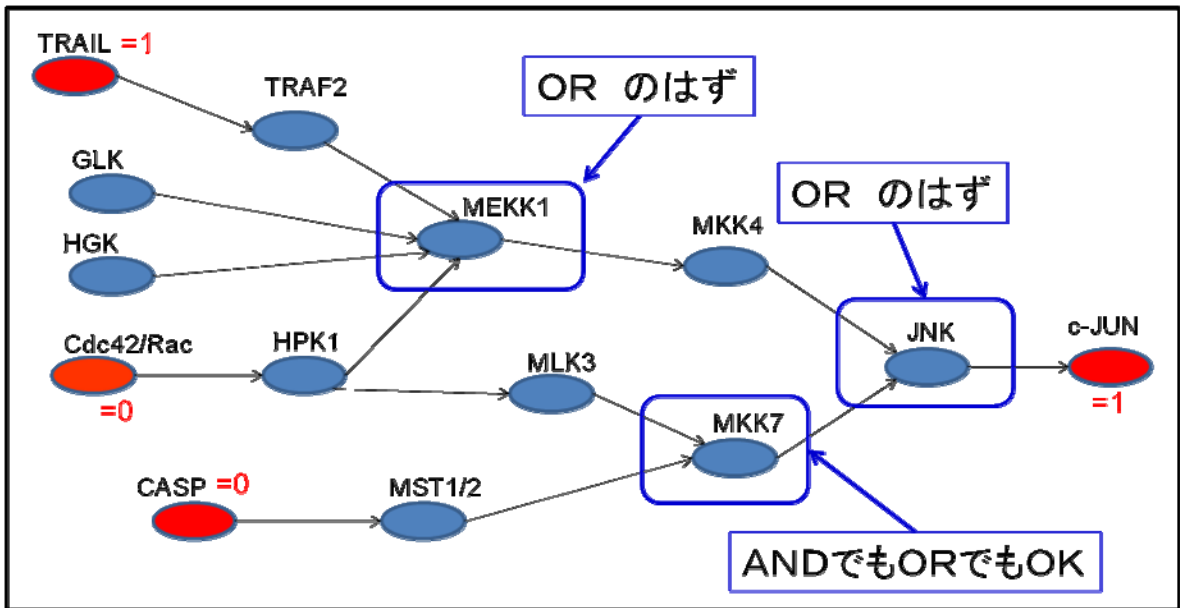


図 2(7)-6 シグナル伝達ネットワークのブーリアンモデルにおけるネットワーク補完の概念図。

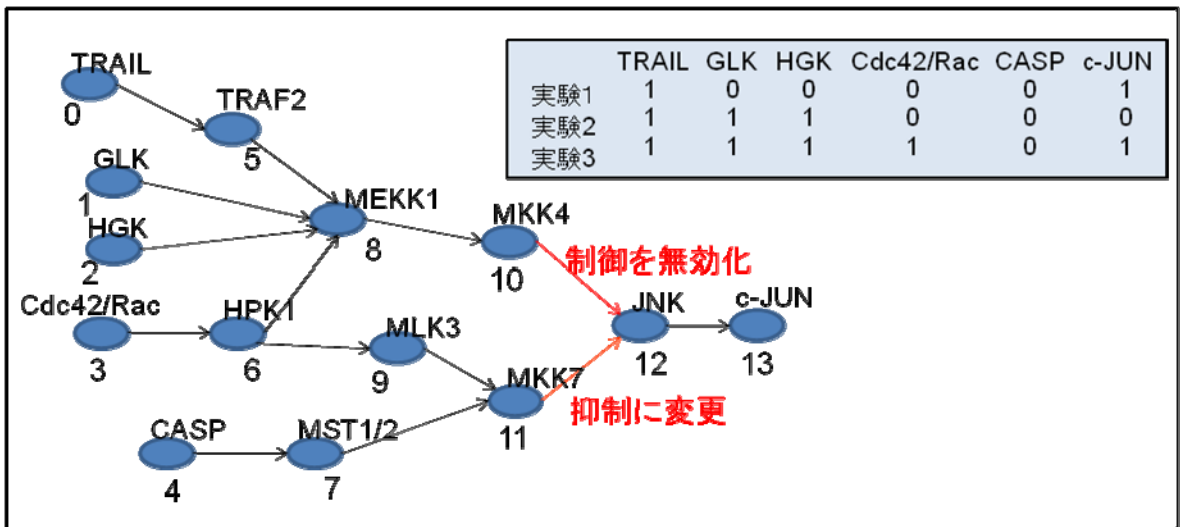


図 2(7)-7 シグナル伝達ネットワークに整数計画法に基づくネットワーク補完手法を適用した結果。

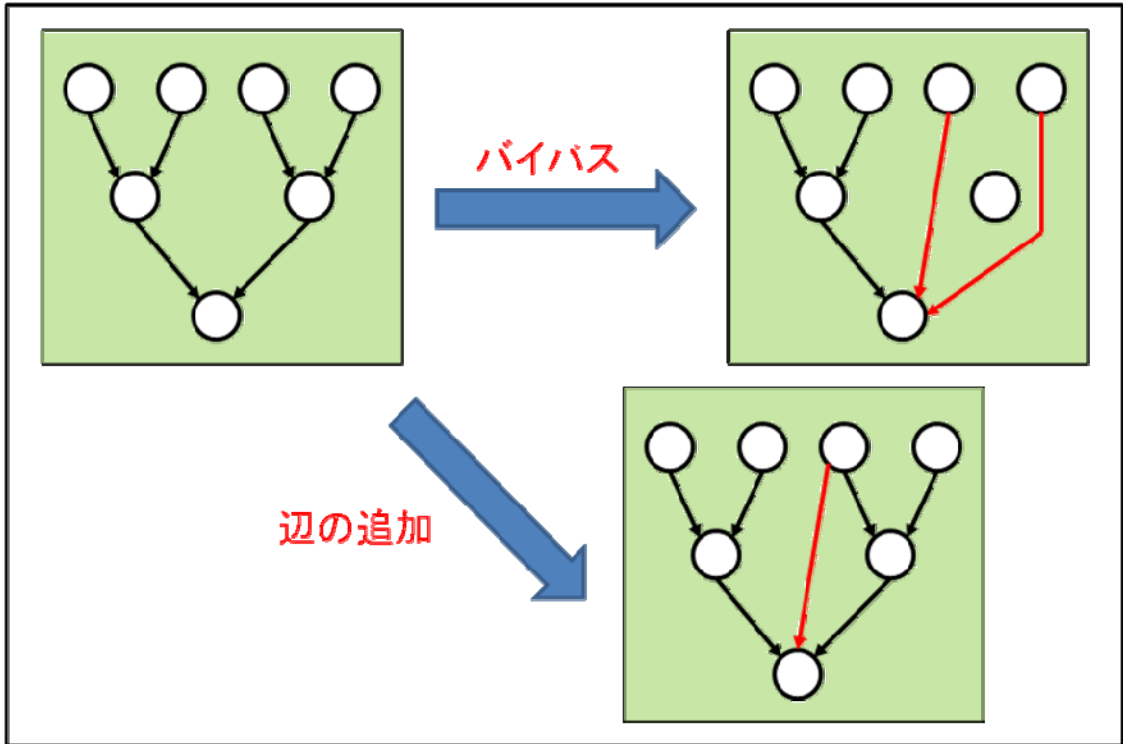


図 2(7)-8 最小二乗法を用いたネットワーク補完アルゴリズムにおける二種類の局所補完方式。

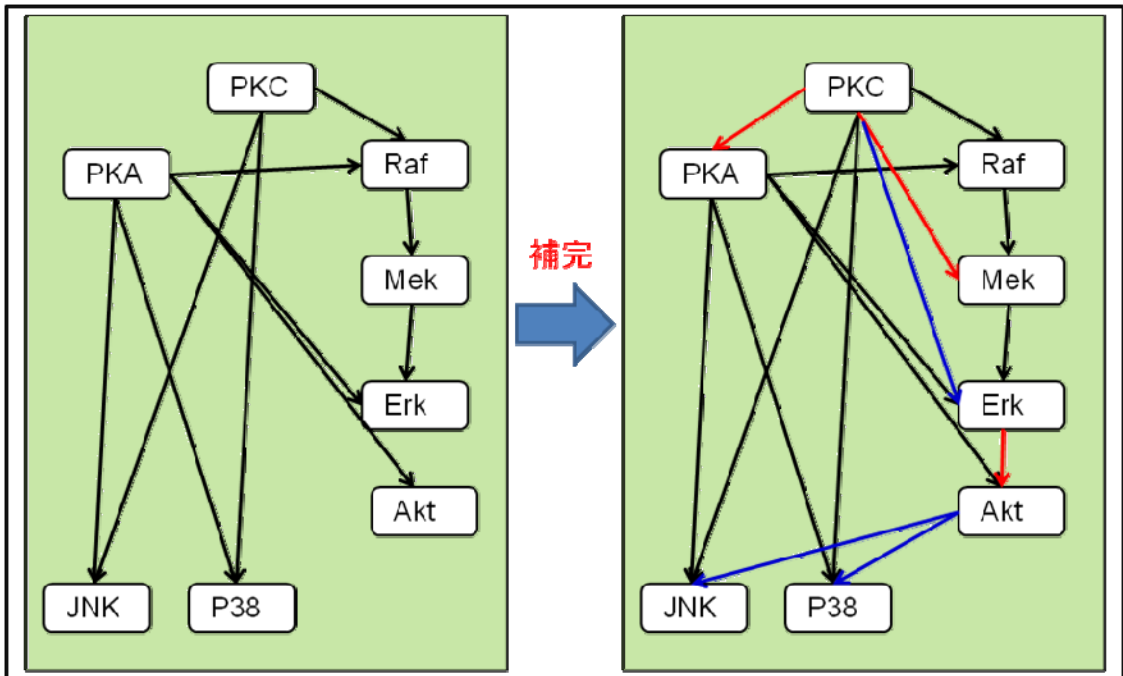


図 2(7)-9 最小二乗法を用いたネットワーク補完アルゴリズムによるシグナル伝達ネットワークの補完結果。赤色と青色の辺が補完により新たに追加された。

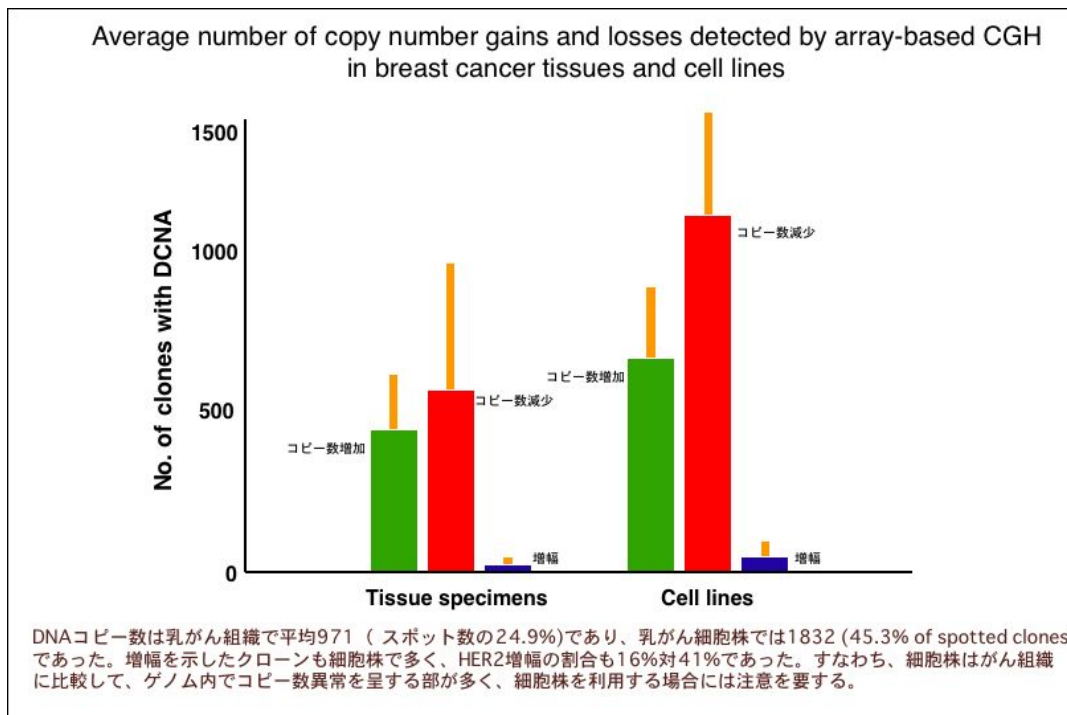


図 2(8)-1

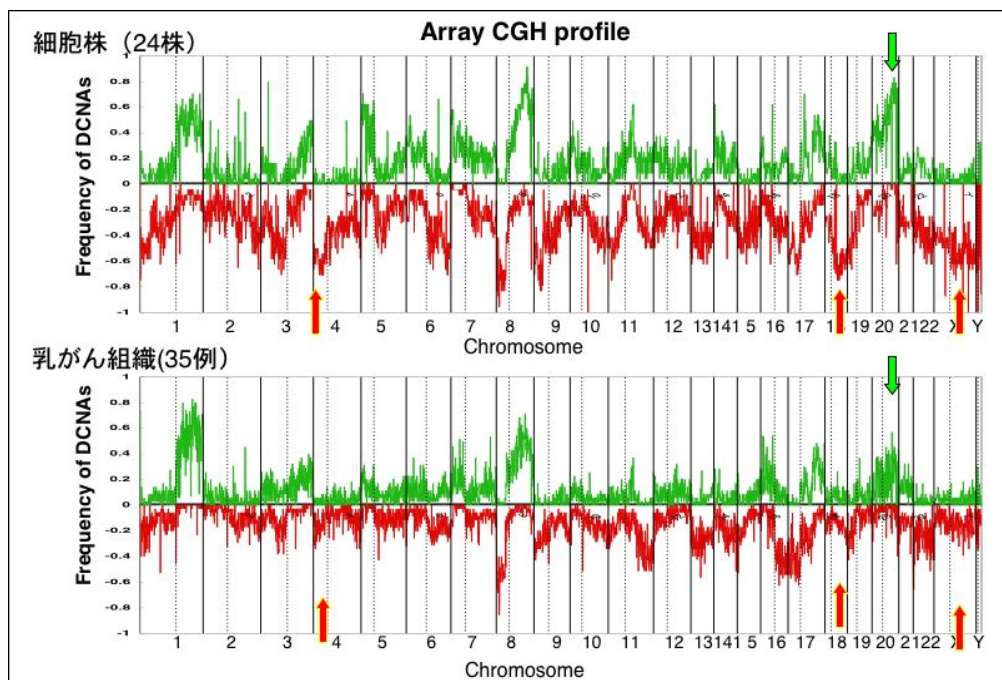
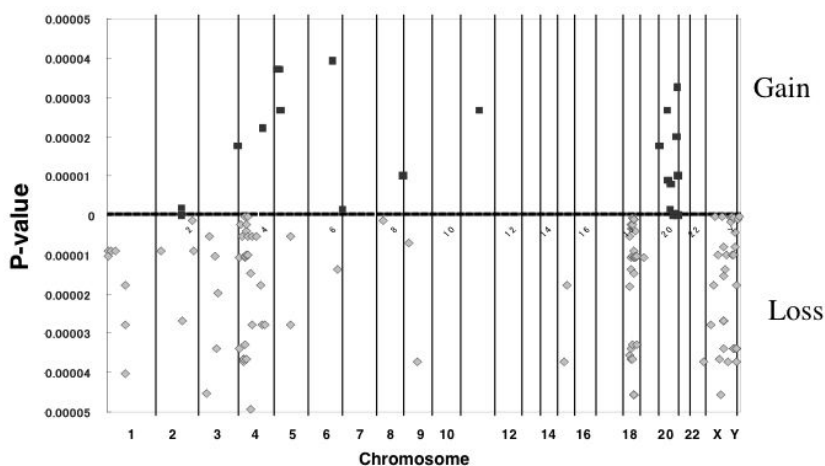


図 2(8)-2

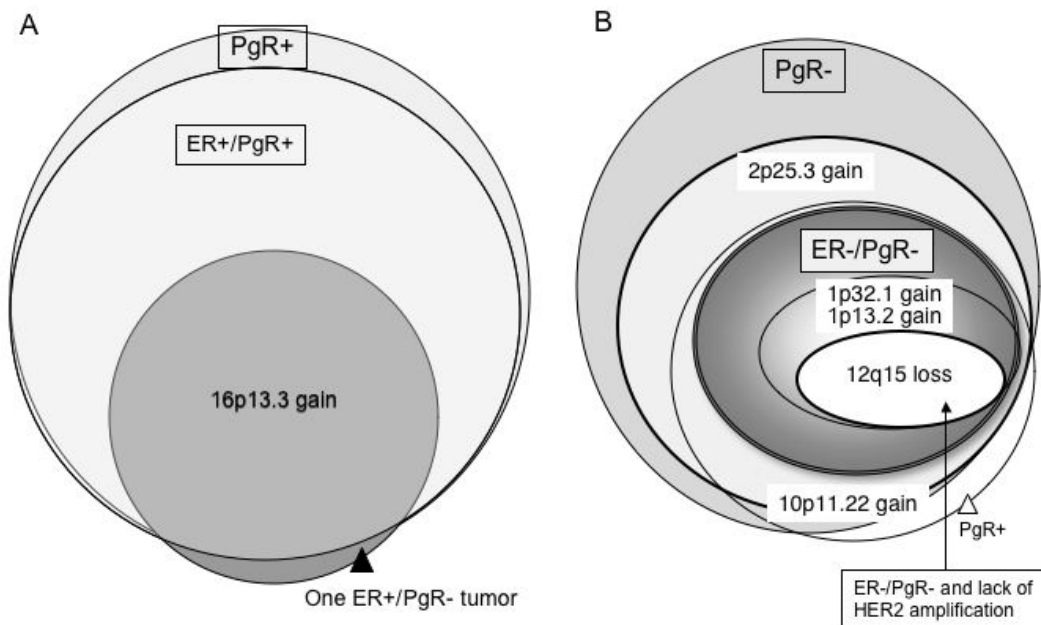
P-values and chromosomal regions with significant difference in the frequency of DNA copy number gains



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 25 ER+/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

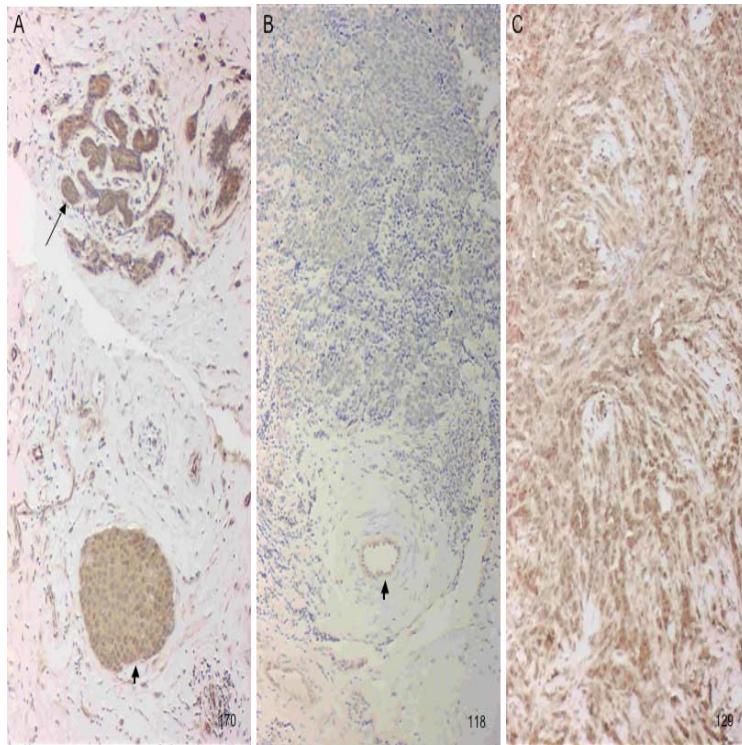


図 2(8)-5 A と C とでは 12q15 のコピー数減少が見られない症例であり、免疫組織化学では”A”の発現が認められる。一方、12q15 のコピー数減少を呈した、triple negative 乳癌では、その発現は陰性であった。

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

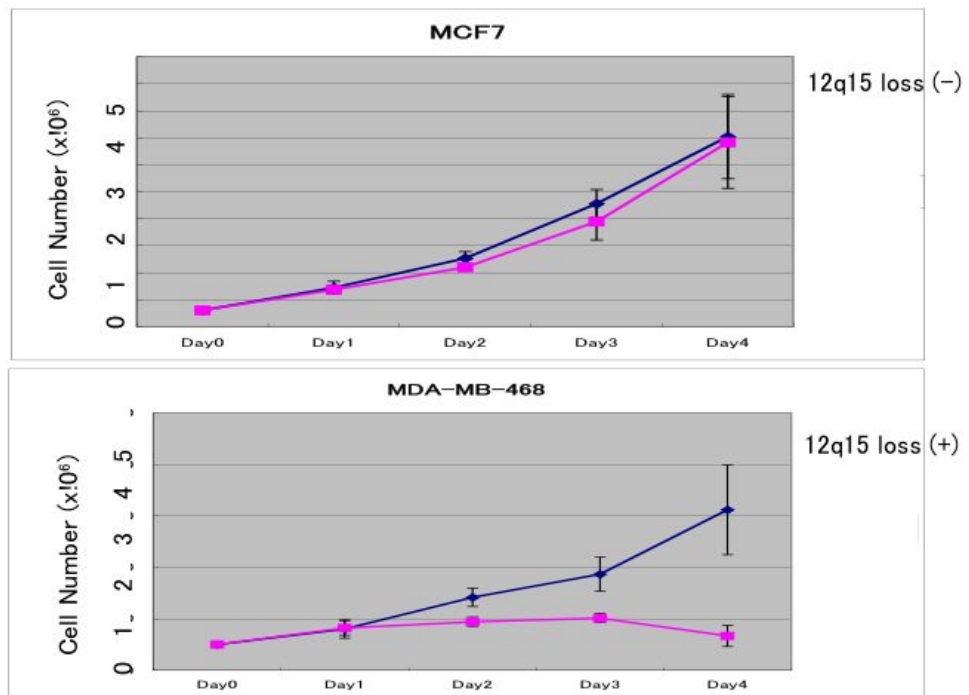


図 2(8)-6

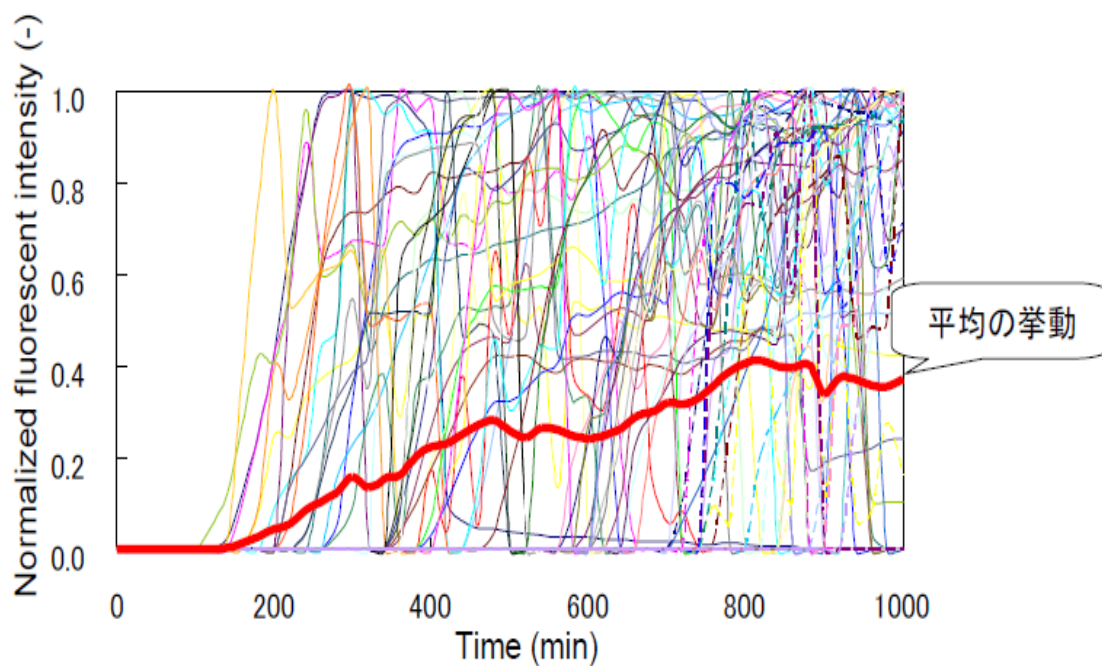


図 2(9)-1 細胞毎の EGFP の経時的挙動

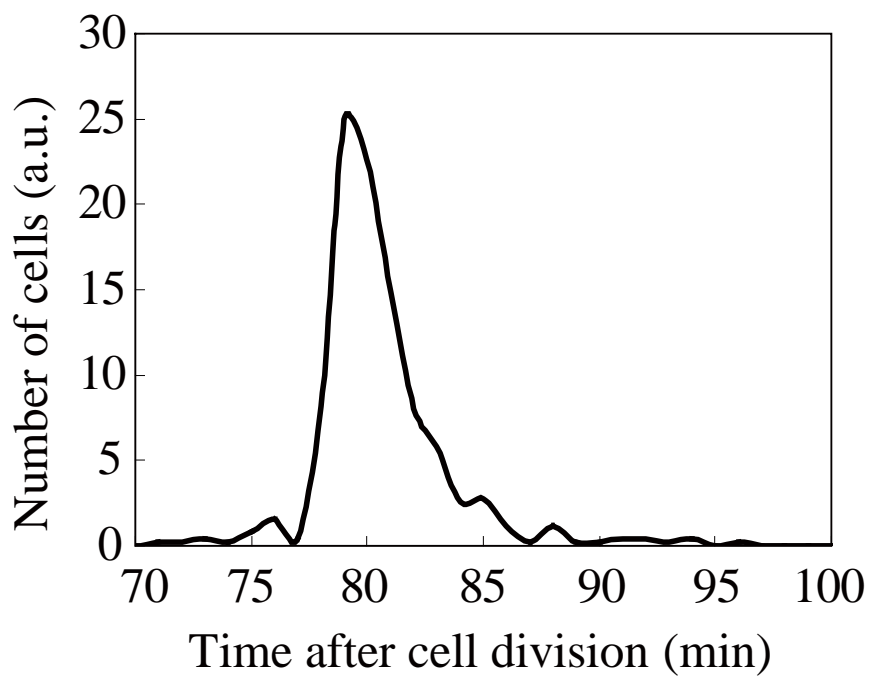


図 2(9)-2 細胞分裂から遺伝子発現開始までに各細胞が要した時間の頻度分布

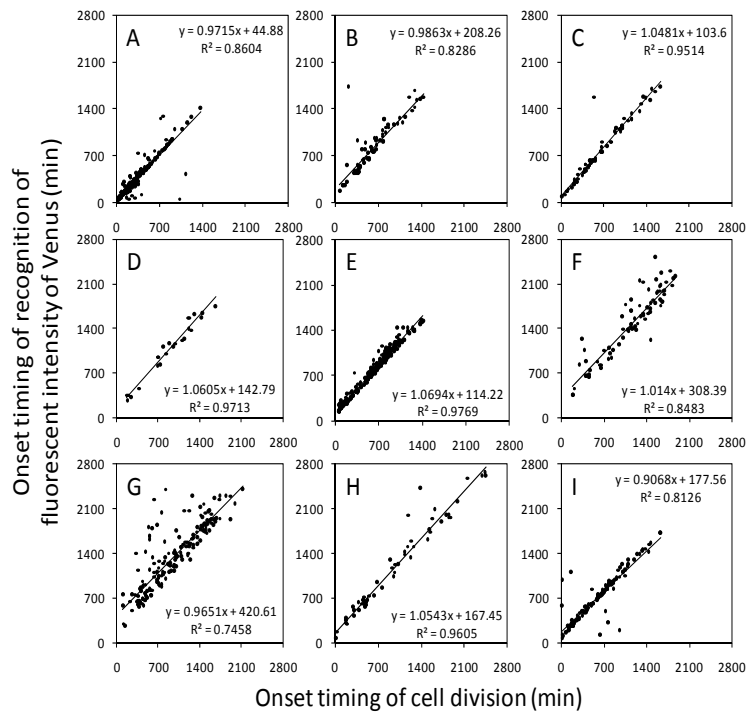


図2(9)-3 9つのトランスフェクション試薬を用いて細胞分裂と遺伝子発現開始の相関

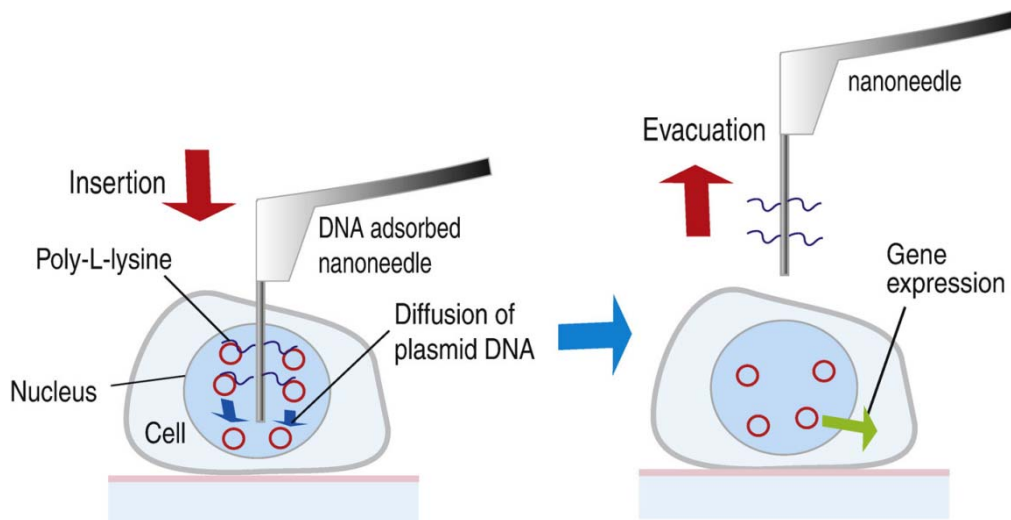


図 2(9)-4 ナノ針による直接核内に遺伝子を送達する方法

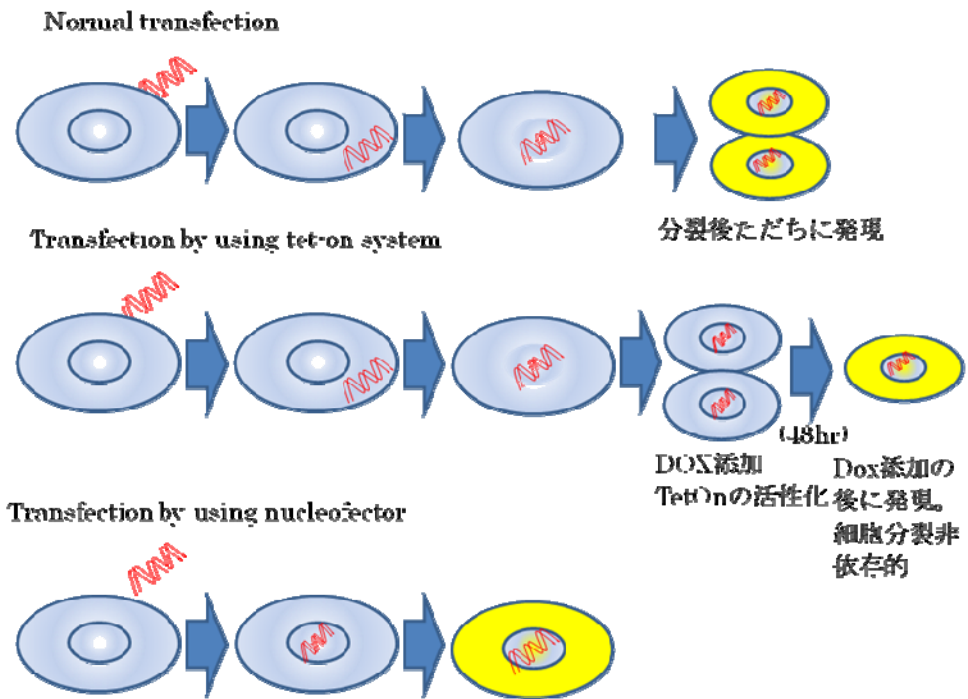


図 2(9)-5 遺伝子導入メカニズムの細胞周期依存性、核膜移行依存性に対するアプローチ方法

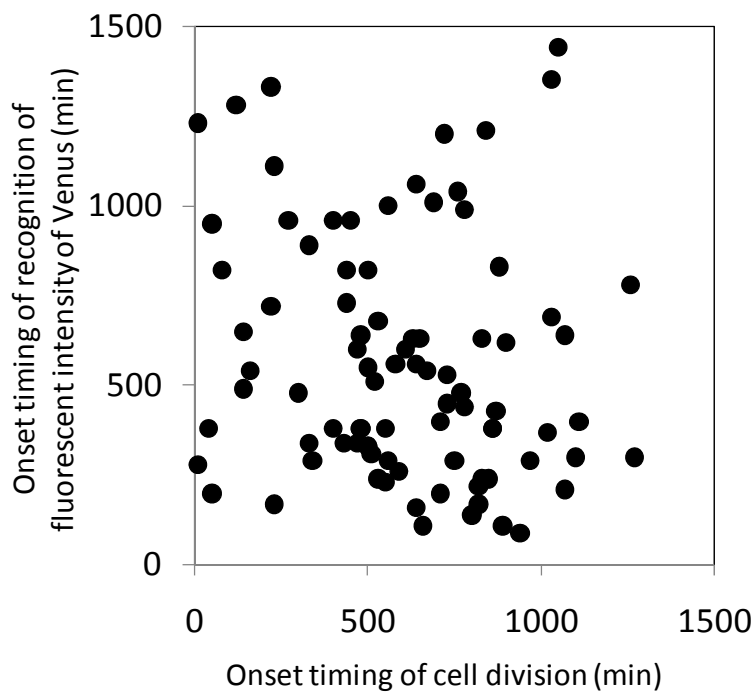


図 2(9)-6 Tet-system を用いた時の細胞分裂と遺伝子発現開始時間の相関性

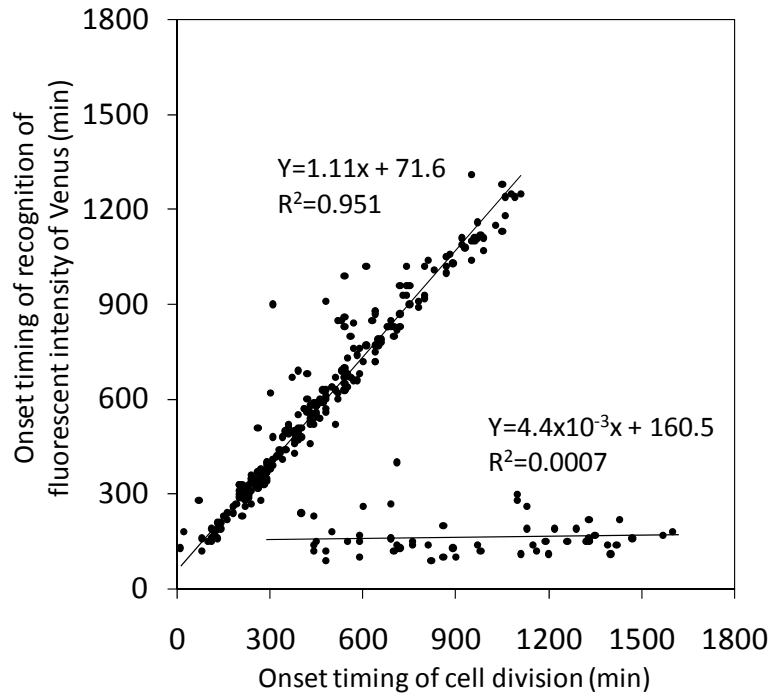


図 2(9)-7 Electroporation を用いた時の細胞分裂と遺伝子発現開始時間の相関性

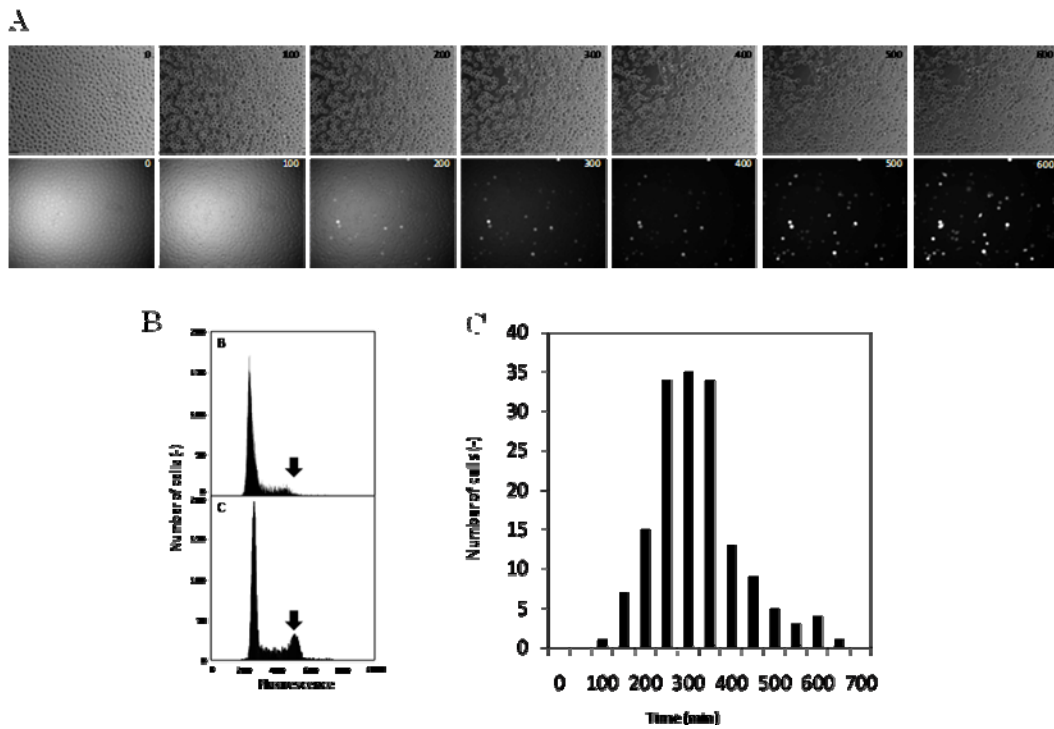


図 2(9)-8 細胞周期を停止させた状態におけるエレクトロポレーションによる遺伝子導入の結果

- 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

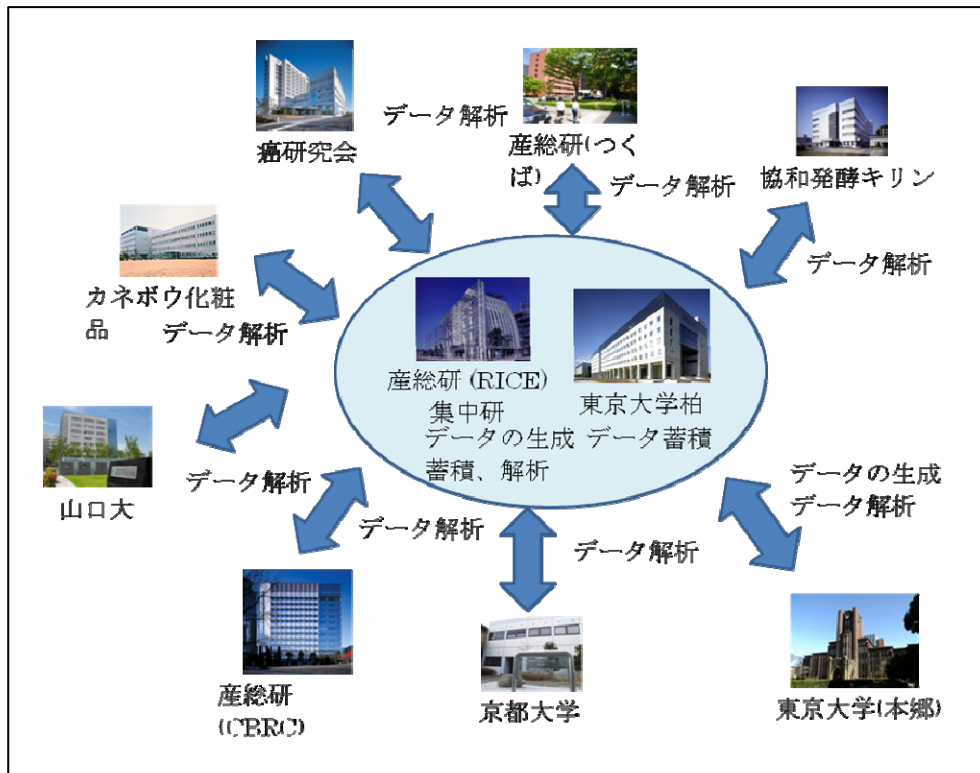


図 2(10)-1 データストレージ運用図

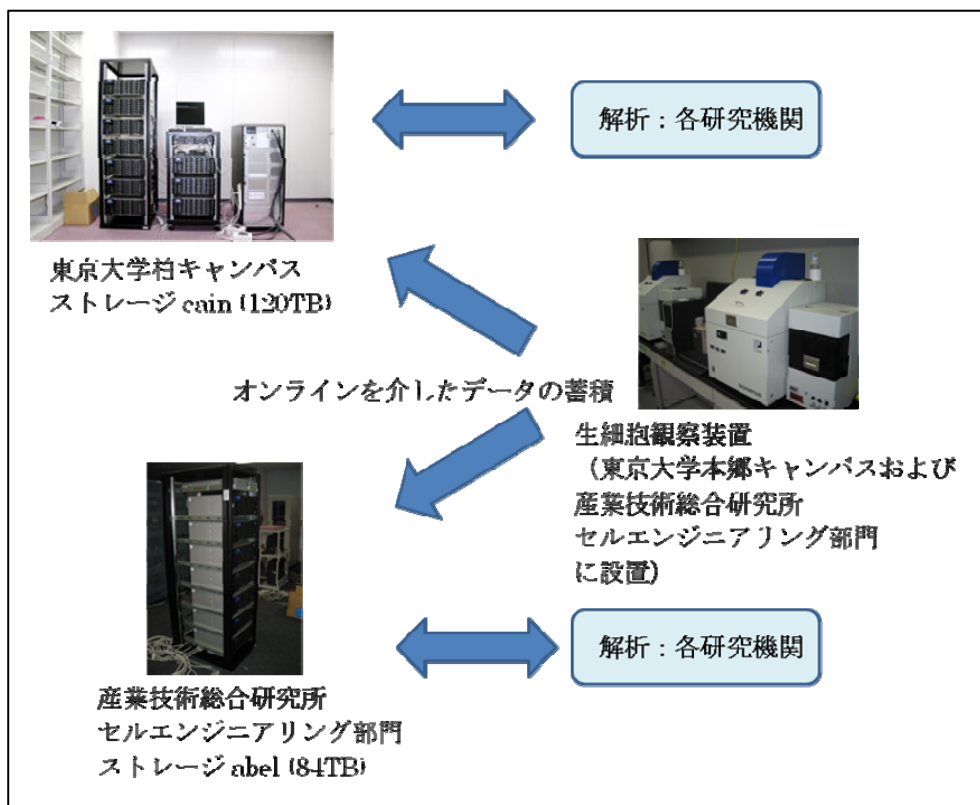
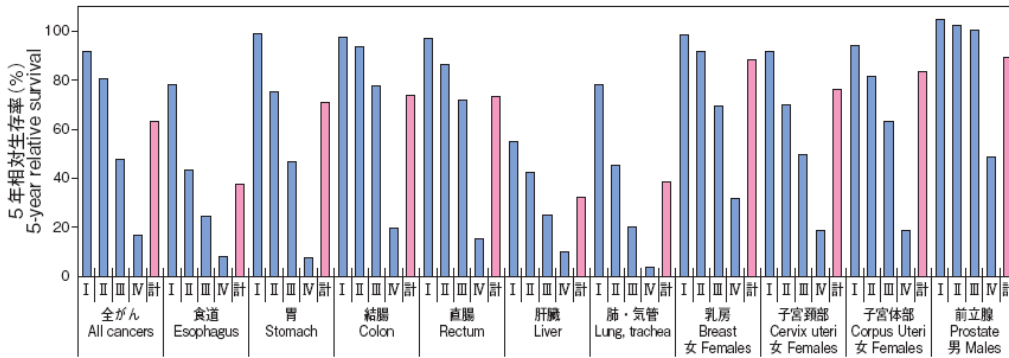


図 2(10)-2 データストレージと生細胞観察装置間におけるデータ授受の模式図

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)

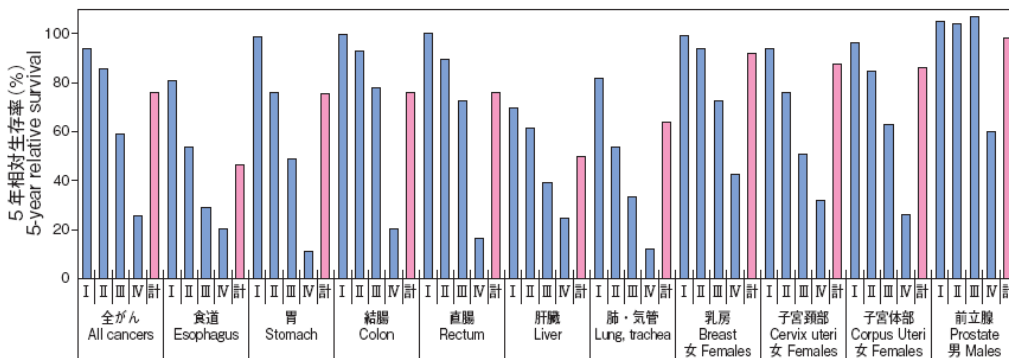


図 3(1)-1 全国がん (成人病) センター協議会加盟施設における5年生存率 (1998~2001年診断例)

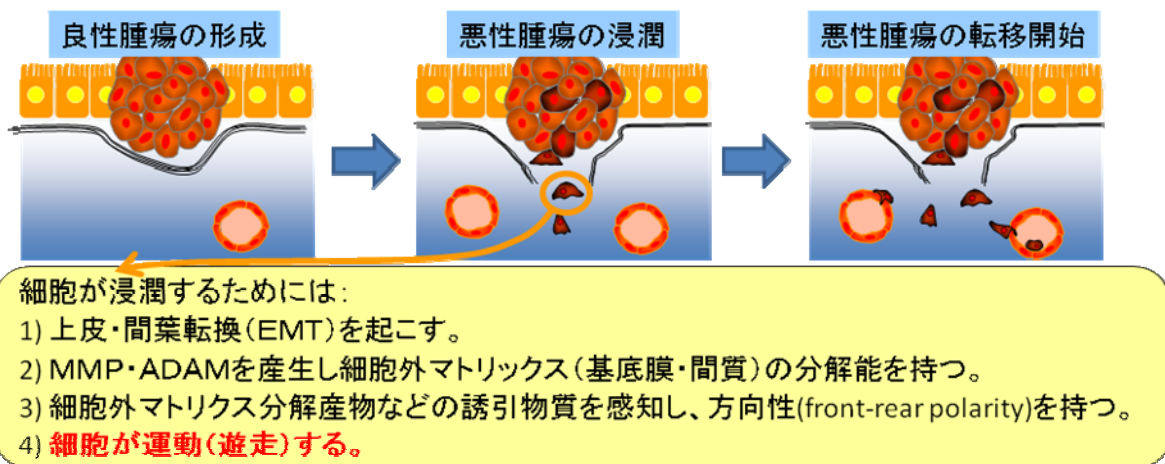


図 3(1)-2 転移のプロセス

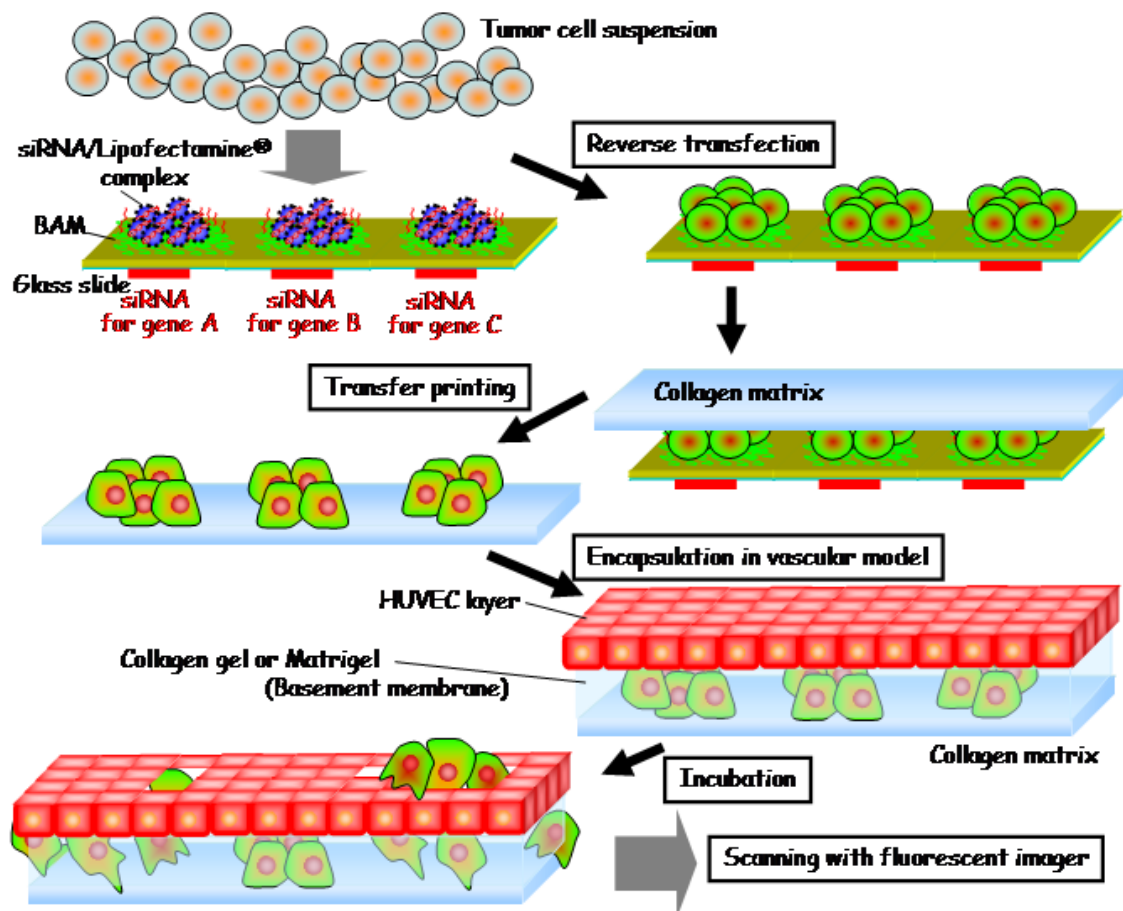


図 3(2)-1 がん細胞浸潤評価チップの概念図

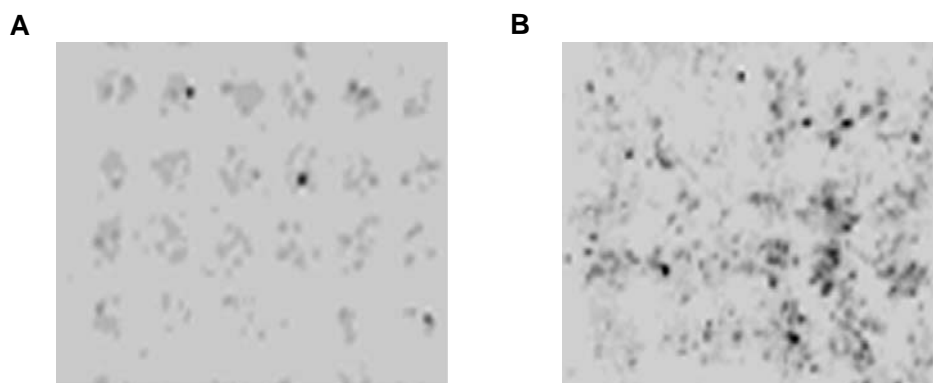


図 3(2)-2 BAM コートスライドガラス上で緑色蛍光蛋白質発現プラスミドを導入したがん細胞のコラーゲンシート上でのアレイ
 (A) HeLa 細胞をアレイした際、(B) NBD-L2B 細胞をアレイした際の蛍光イメージャー画像 (488 nm 励起)。シート上に転写後、67 時間培養。

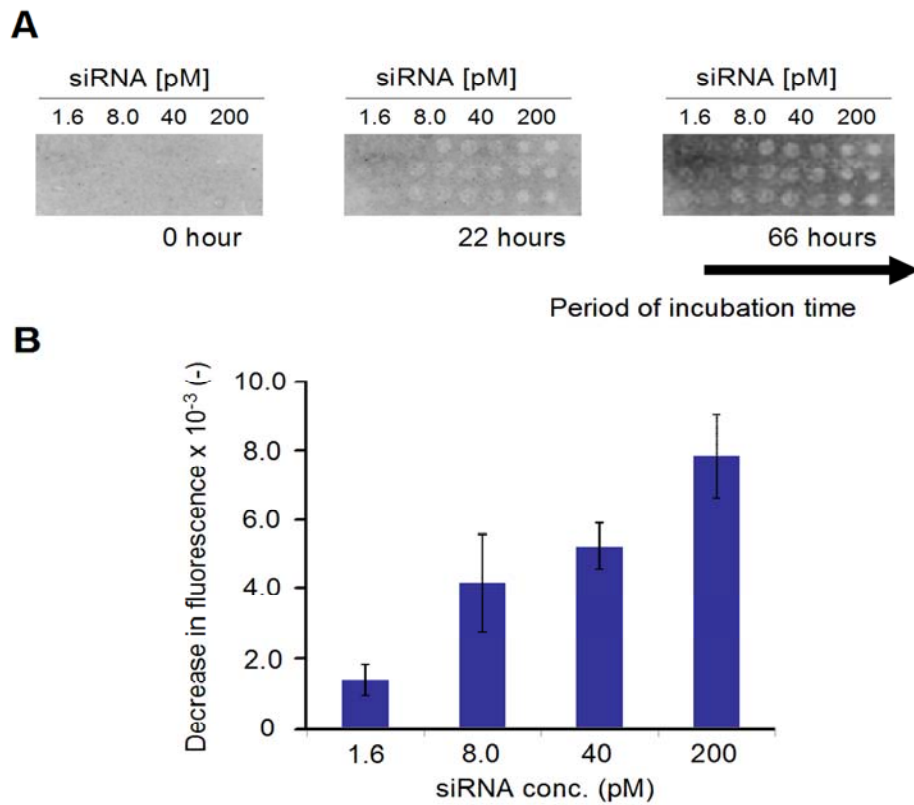


図 3(2)-3 BAM コートスライド上で anti-EGFP siRNA を導入した EGFP 恒常発現 HeLa 細胞のコラーゲンシート上でのマイクロアレイ (A) 蛍光イメージャー画像 (488 nm 励起)、(B) siRNA 非固定化位置に対する固定化スポット位置の蛍光減少量。siRNA 濃度は、BAM コートスライドにスプレイした siRNA 水溶液の濃度を表記。

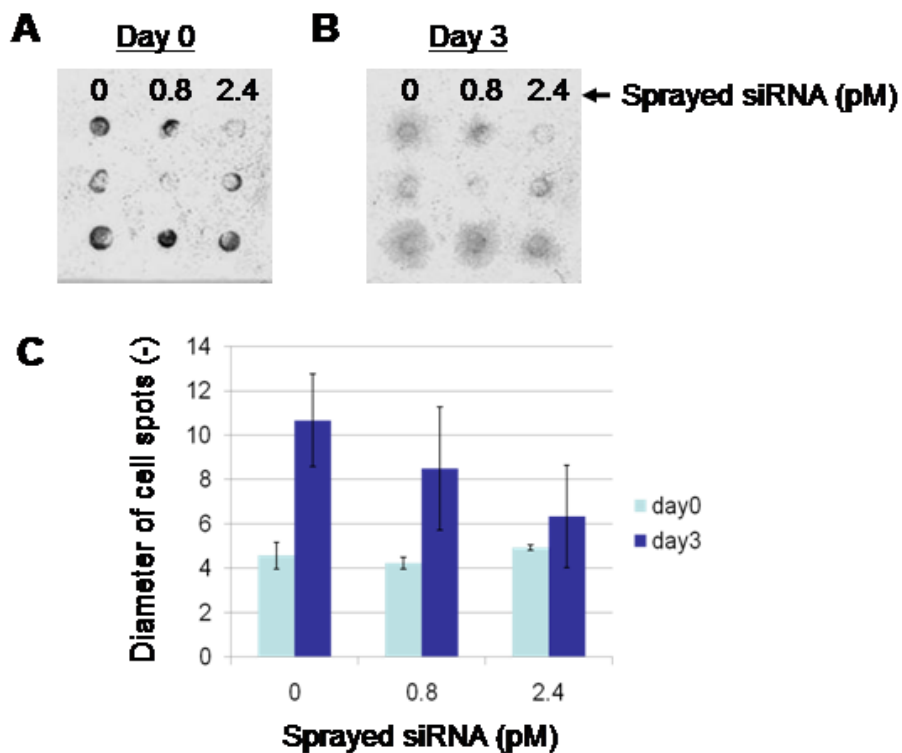


図 3(2)-4 anti-MMP14 siRNA を導入した蛍光染色 HT1080 細胞スポットを内包したコラーゲンゲルの蛍光イメージング： (A) 内包直後の蛍光イメージャー画像、(B) 3 日間培養後の蛍光イメージャー画像、(C) 蛍光スポットの直径

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。

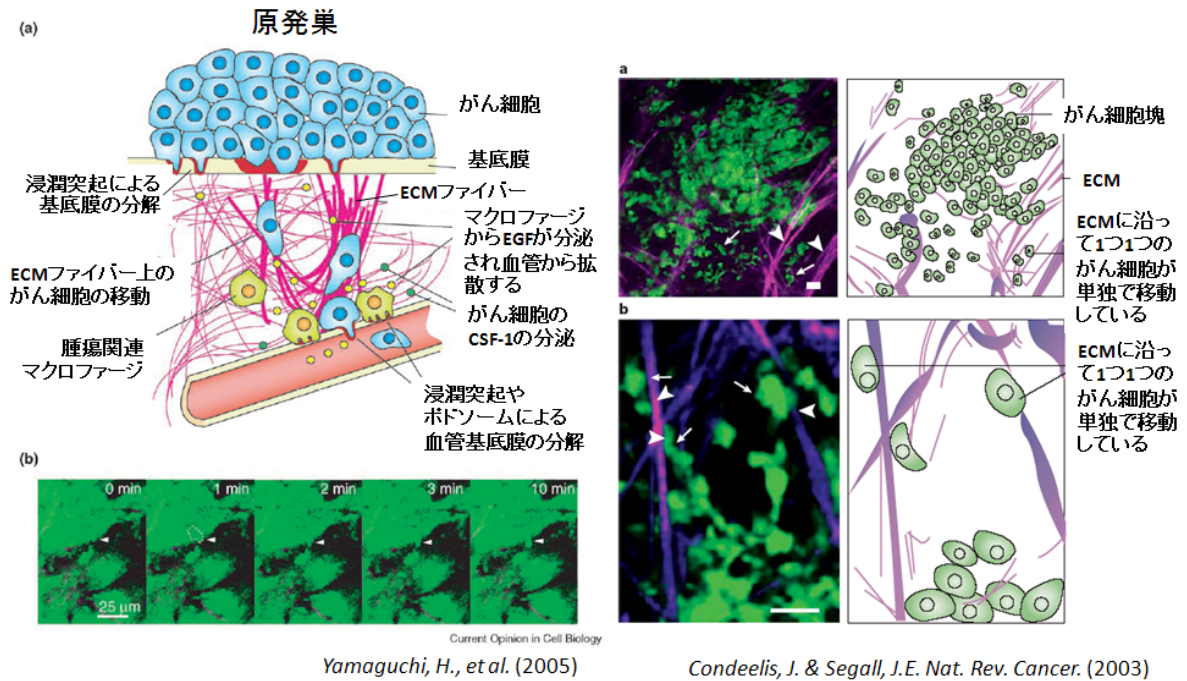


図 3(2)-5 がん組織での細胞運動

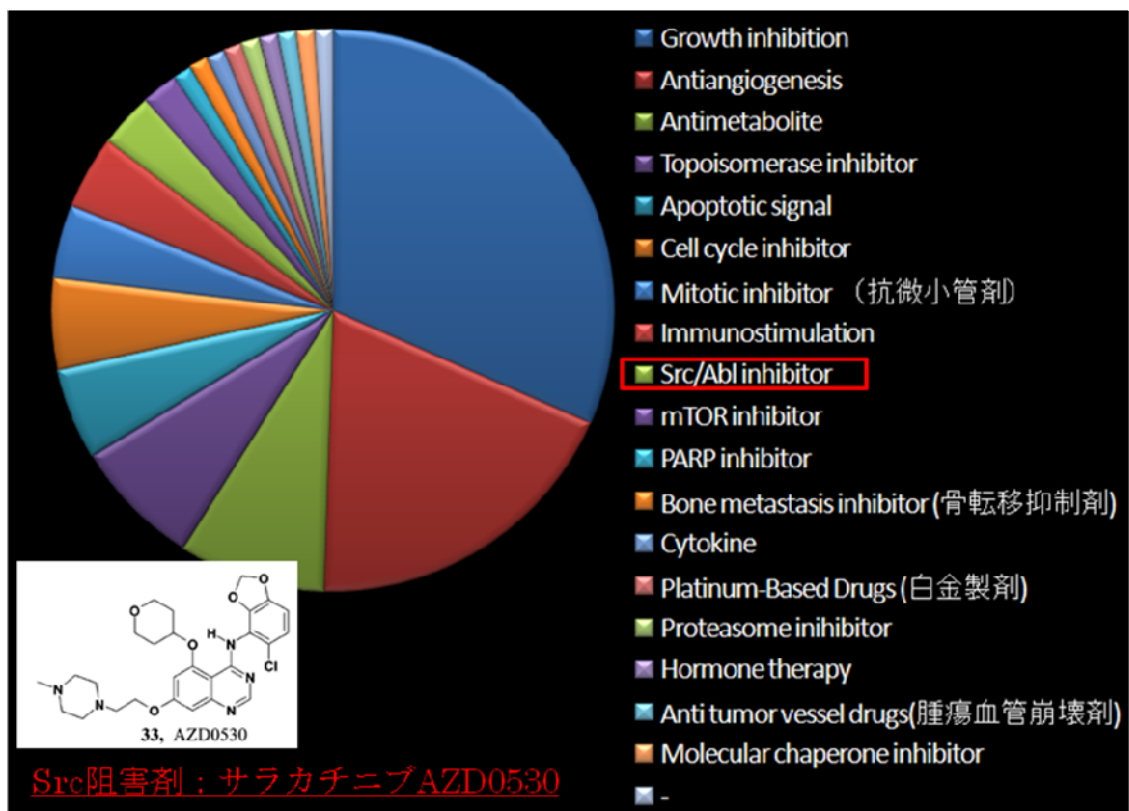


図 3(2)-5B 抗がん剤の開発状況

(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

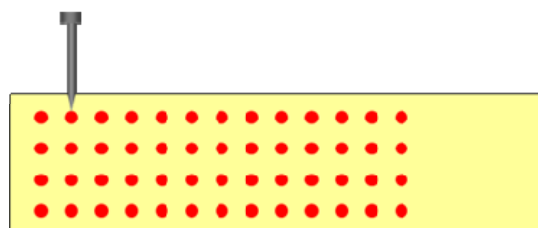


図 3(2)-7 細胞運動評価セルチップの作成

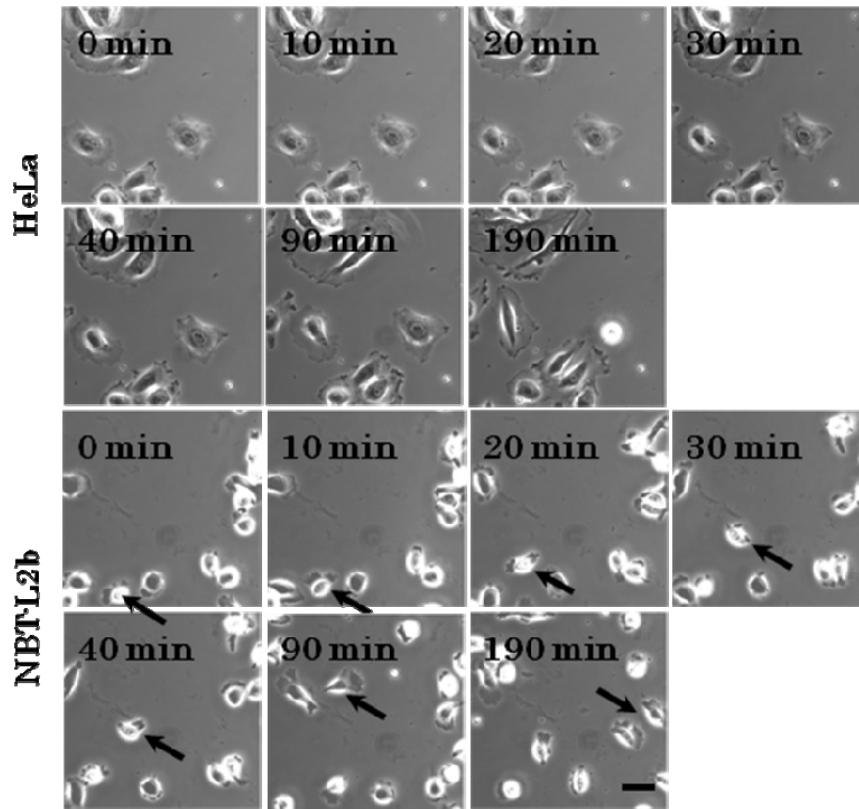
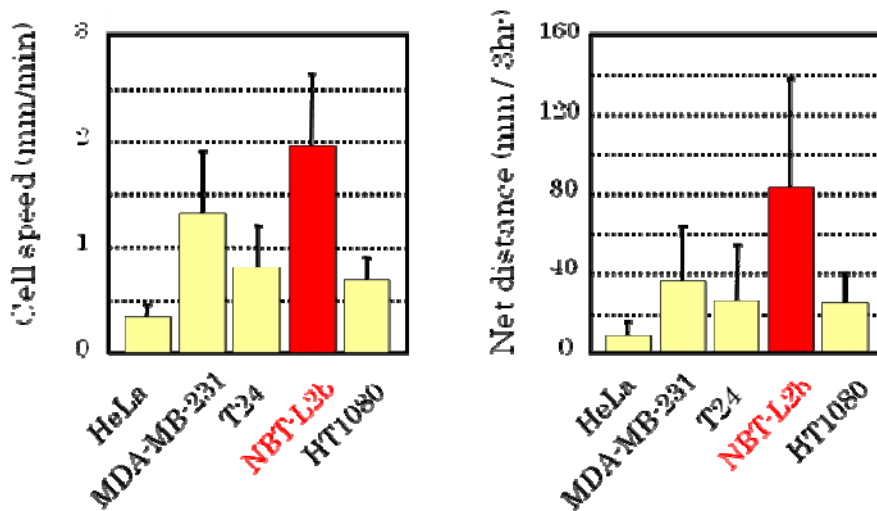


図 3(2)-8 細胞の運動能の比較



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

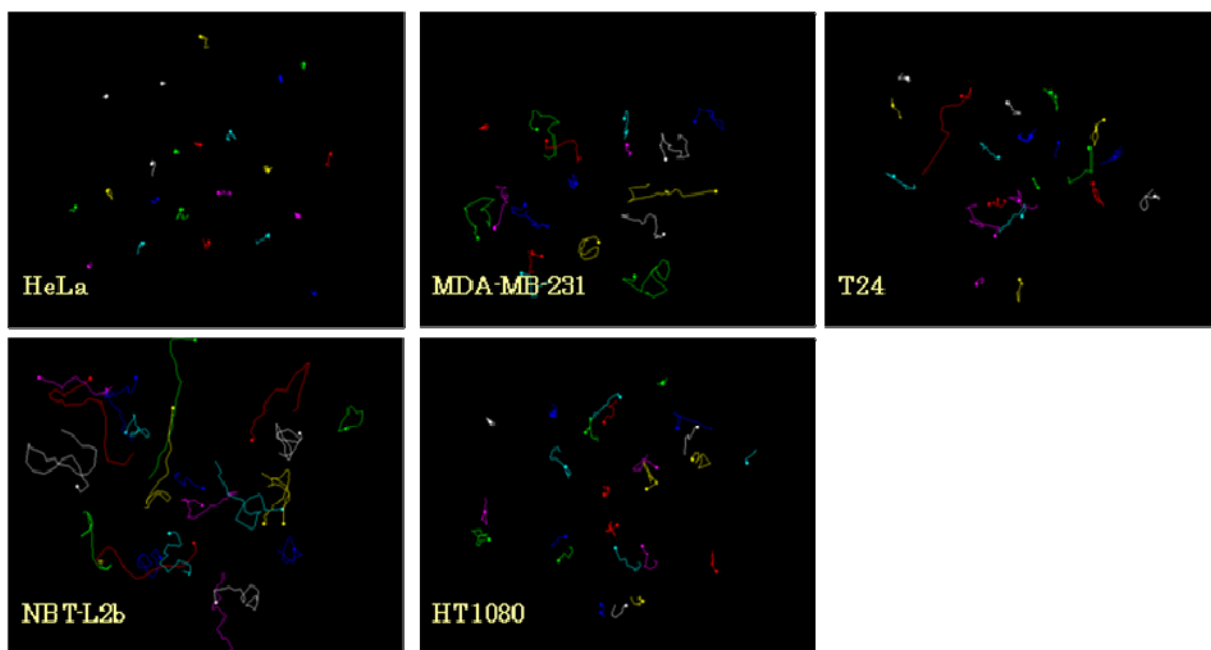
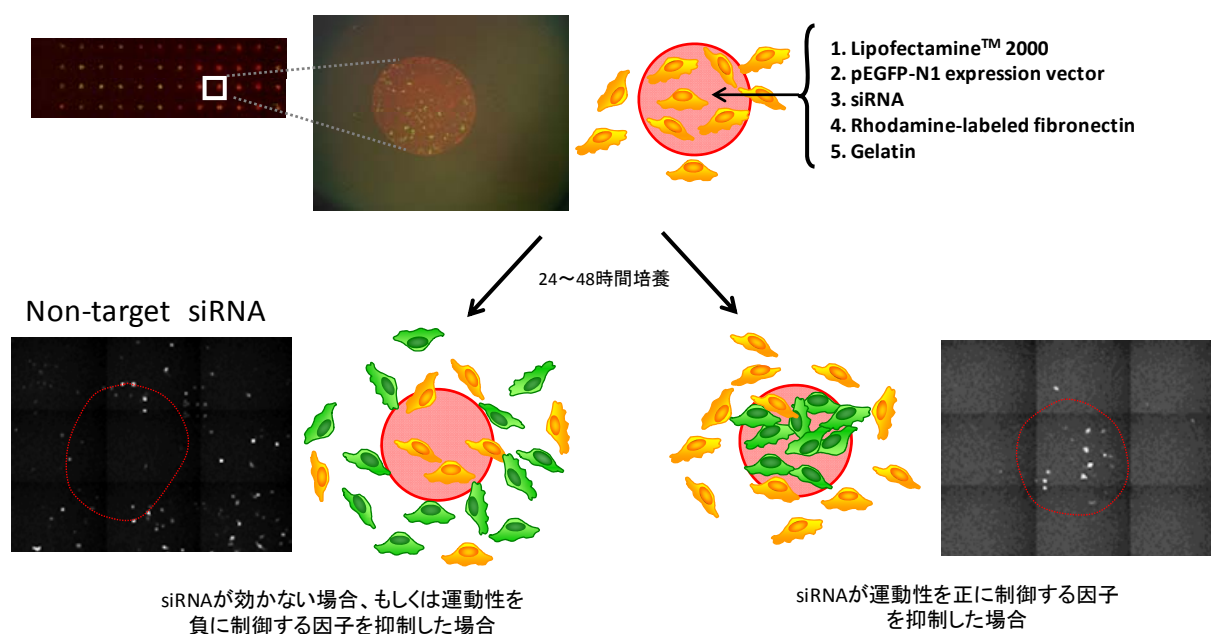


図 3(2)-10 細胞運動評価用細胞の選定



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

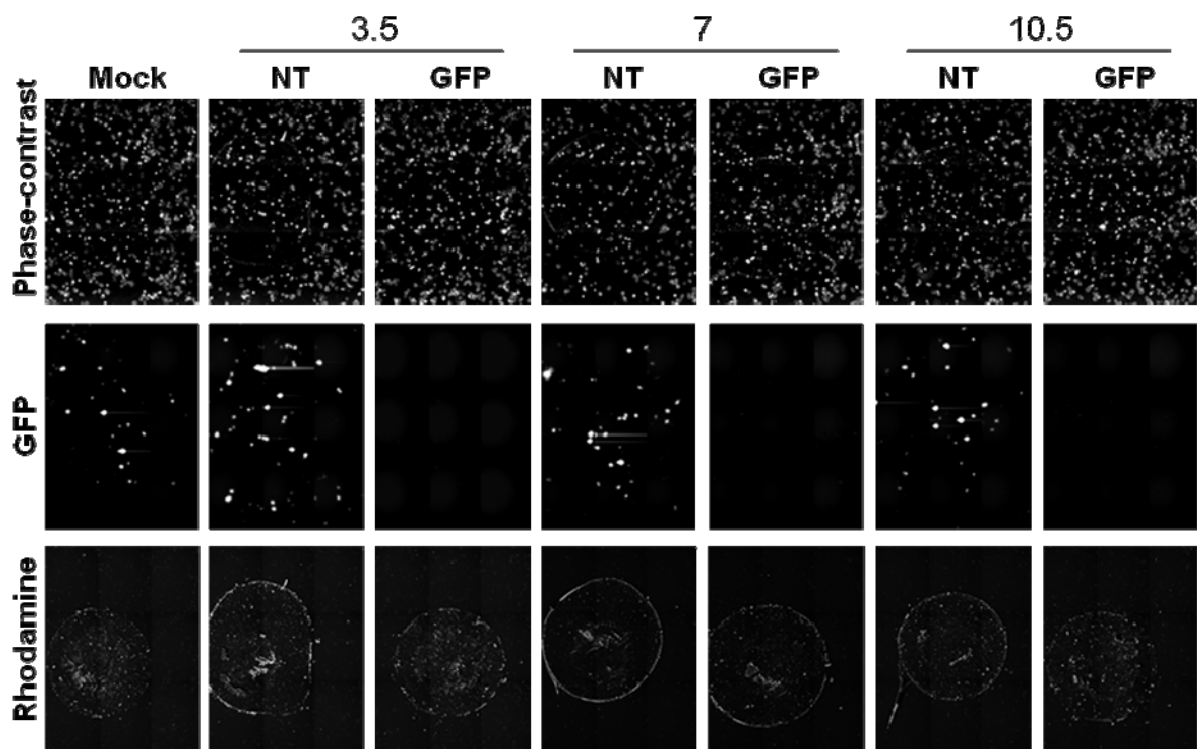


図 3(2)-12 リバーストランスフェクション条件の至適化

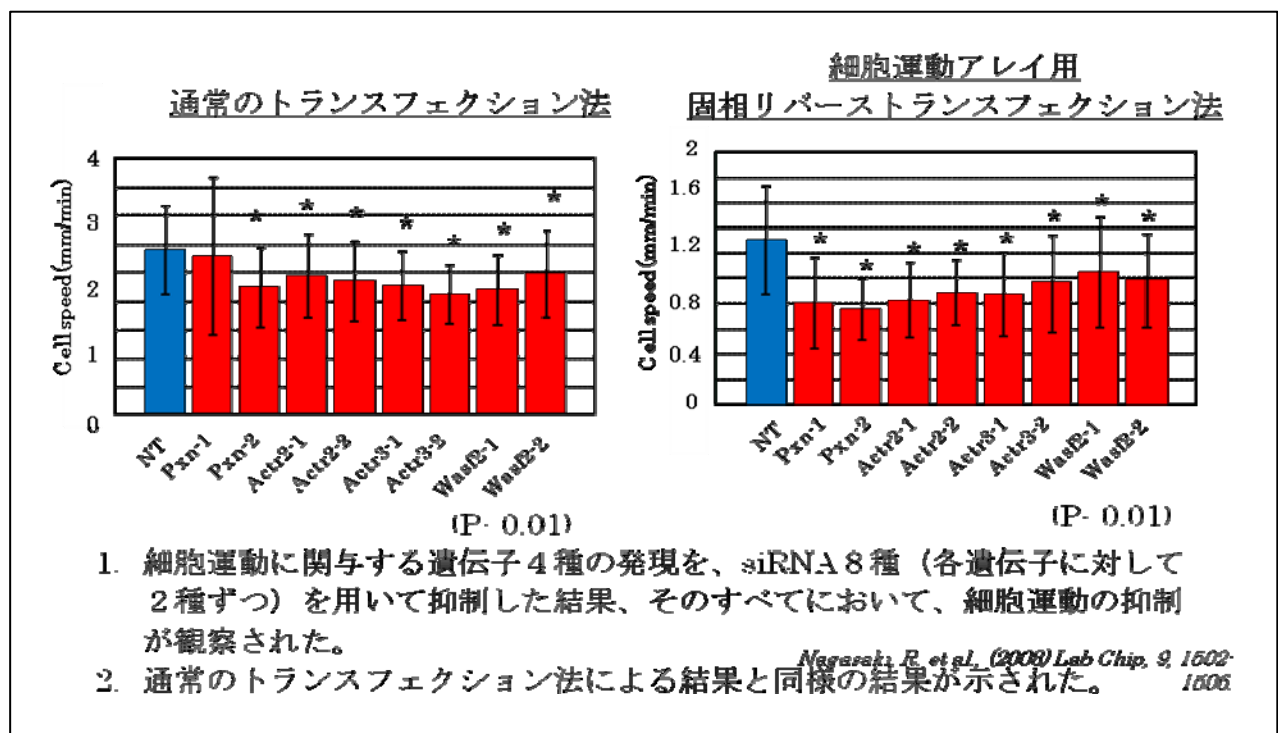


図 3(2)-13 細胞運動を抑制する siRNA を TFA で導入した際の細胞速度の比較

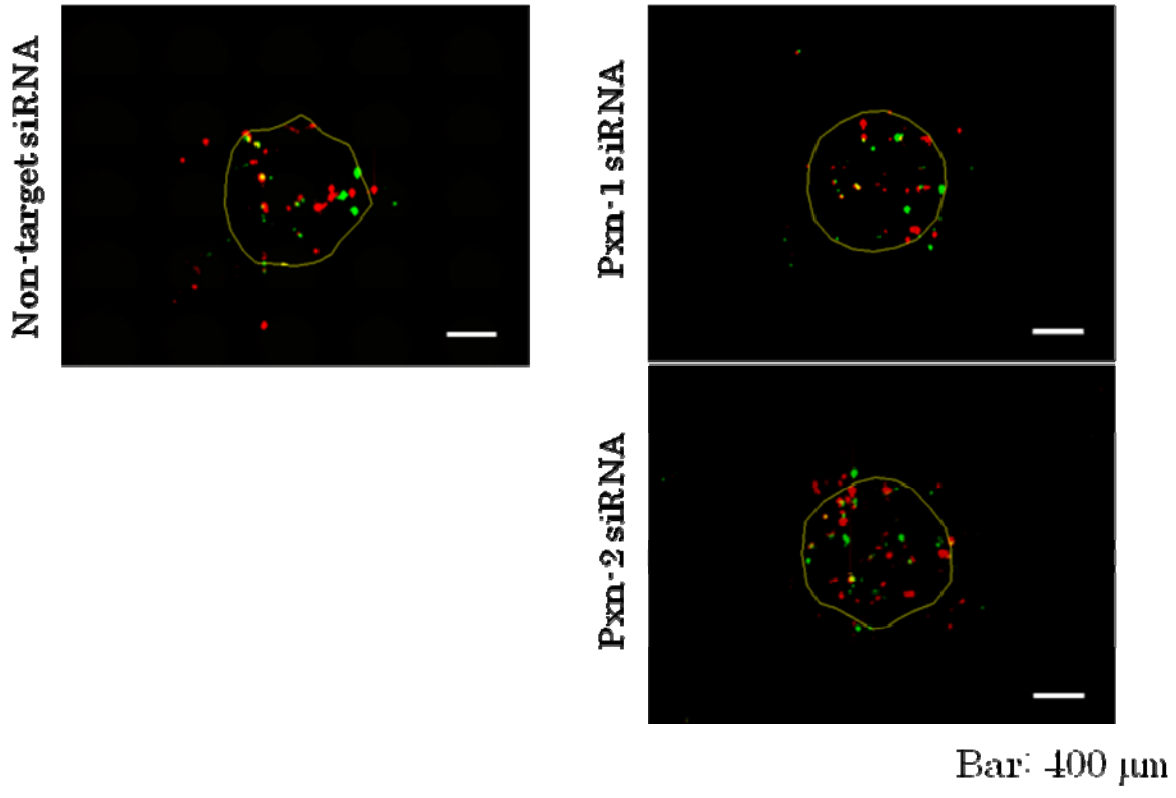


図 3(2)-14 24 時間、48 時間後の細胞移動

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

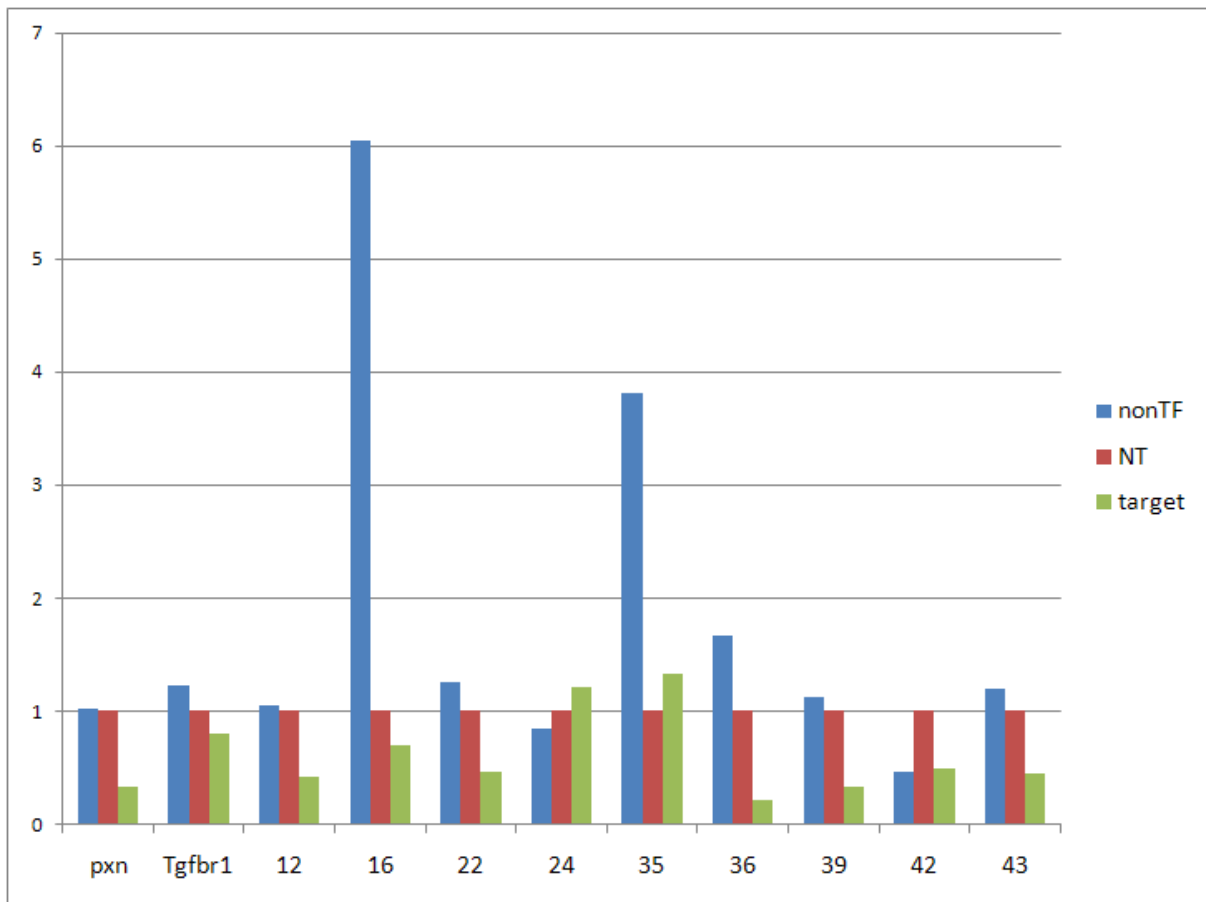


図 3(2)-16 リアルタイム PCR の結果

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

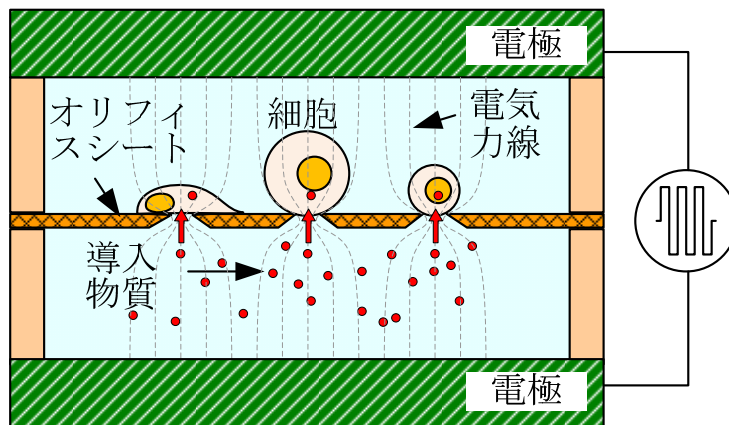


図 3(3)-1 電界集中型エレクトロポレーション装置

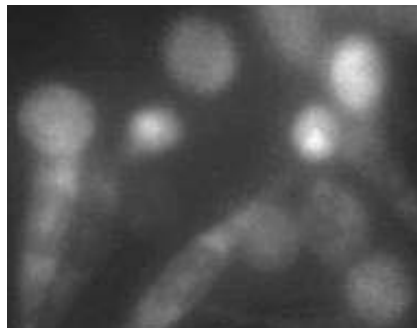


図 3(3)-2 HeLa 細胞に対する GFP タンパク導入
(パルス条件 : 1.5V、10ms、60 パルス)

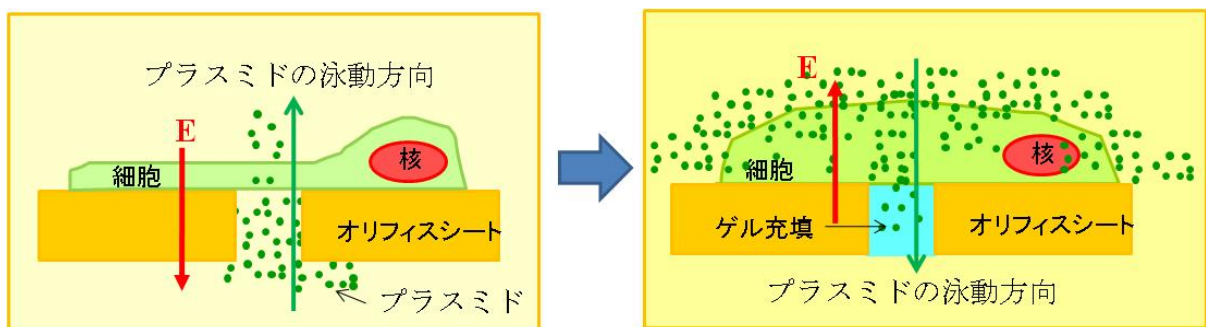


図 3(3)-3 扁平細胞に対するプラスミド導入モデルとゲル充填による基板平坦化

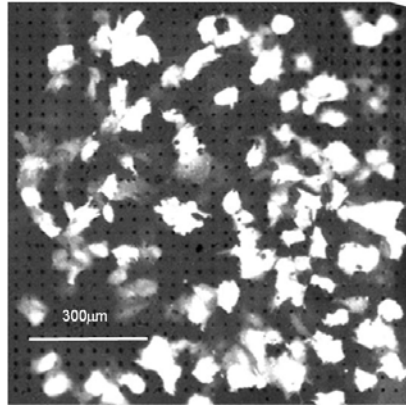


図 3(3)-4 間葉系幹細胞に対する遺伝子導入
20×20 オリフィスアレイ (パルス条件 : 4V、200ms、単発)

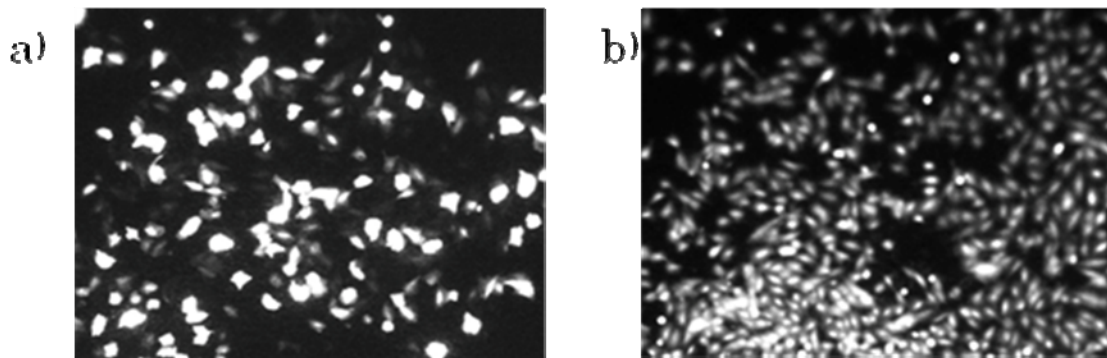


図 3(3)-5 間葉系幹細胞に対する遺伝子導入 (パルス条件 : 5V, 200ms、単発)
写真はパルス印加 5 時間後に、a)細胞内で発現した GFP からの蛍光、および、
b) その後に生死判定のためのカルセイン染色を行った時のカルセインの蛍光
(生細胞が発光)、を同じ位置で観察したものである。

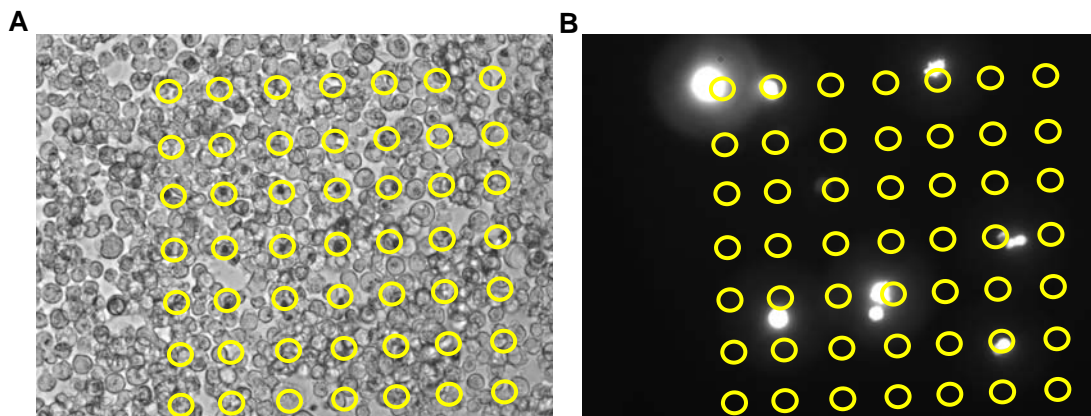


図 3(3)-6 BAM コート絶縁膜上での浮遊系 K562 細胞に対する遺伝子導入(パルス条件 : 10V, 100ms)
写真はパルス印加 24 時間後のオリフィス (○印) 近傍の細胞の顕微鏡画像。
A. 明視野像、B. 緑色蛍光像

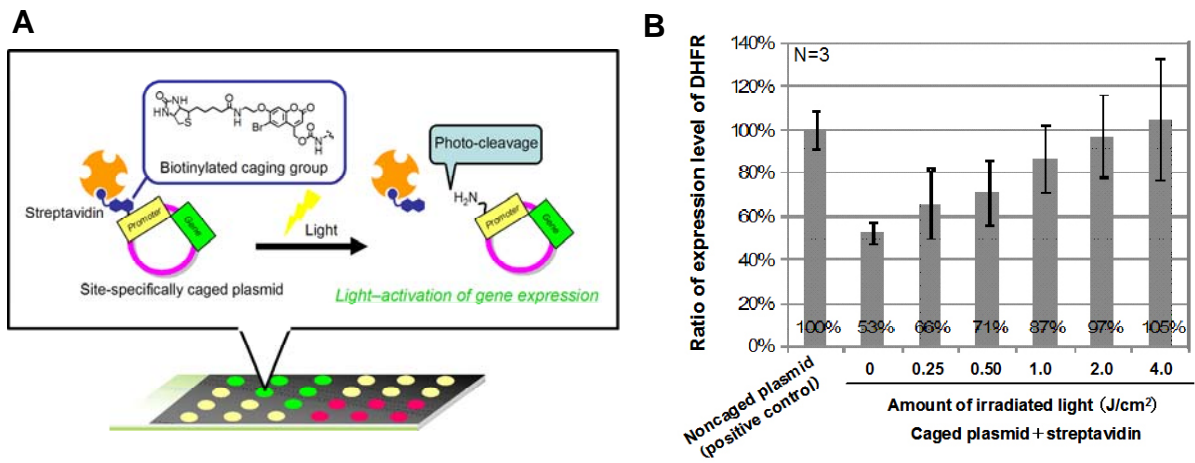


図 3(4)-1 部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドの概念図 (A) とジヒドロ葉酸還元酵素発現プラスミドをモデルとした無細胞蛋白質発現の光コントロール実験結果 (B)

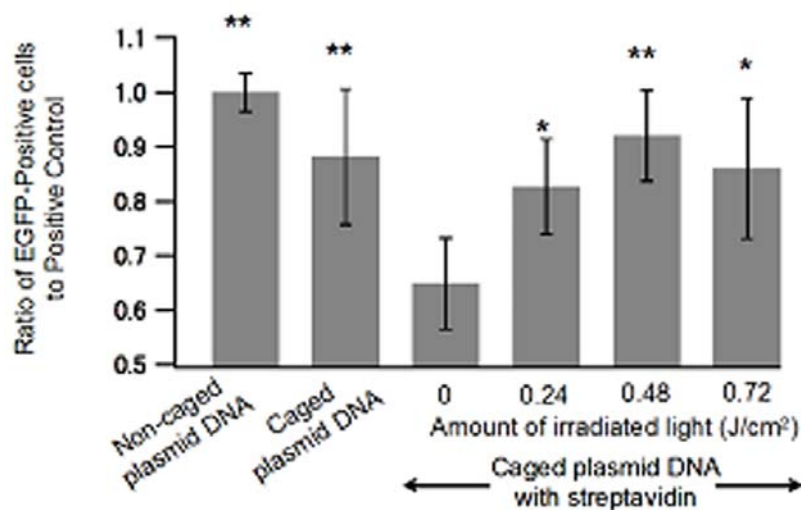


図 3(4)-2 部位特異的ビオチン化ケージング法を用いた細胞内での緑色蛍光蛋白質発現の光制御

図表
(第4章 4-2)

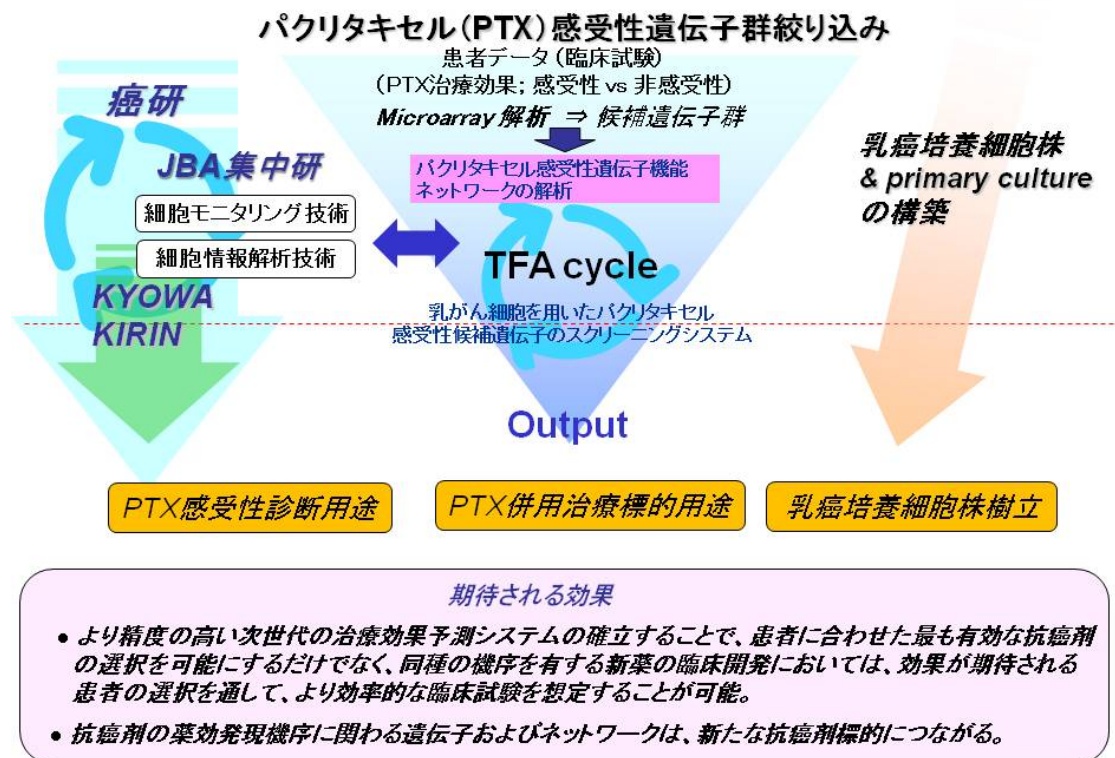


図 4(2)-1 創薬ターゲット同定技術ケーススタディー

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

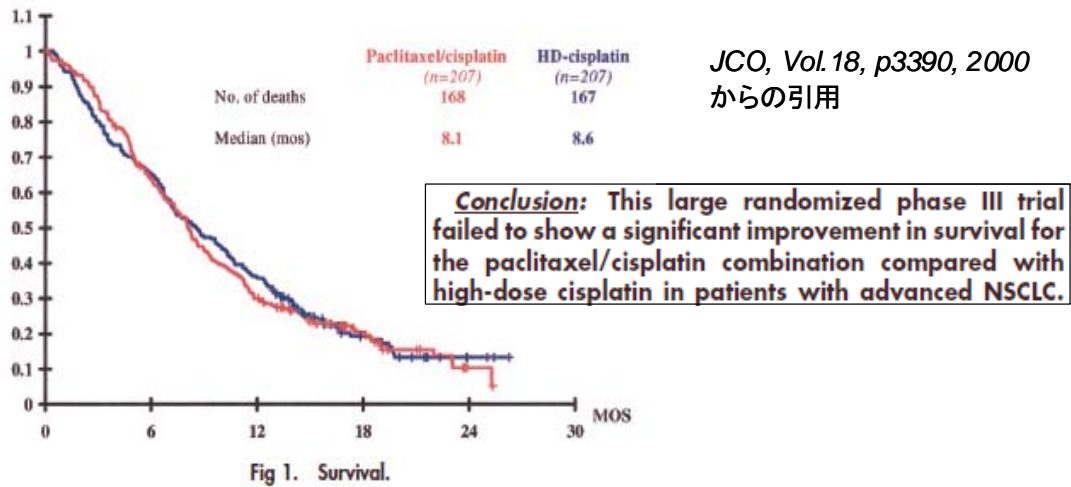
がん細胞の増殖を選択的に阻害するメカニズムでは無い

【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

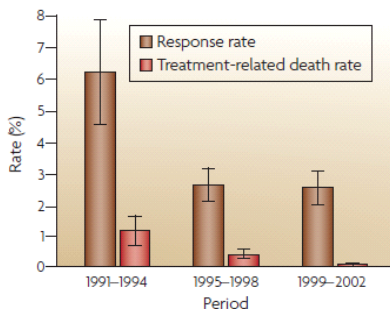
- ◆ がん細胞表面抗原や分泌因子中和を標的とする抗体医薬

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

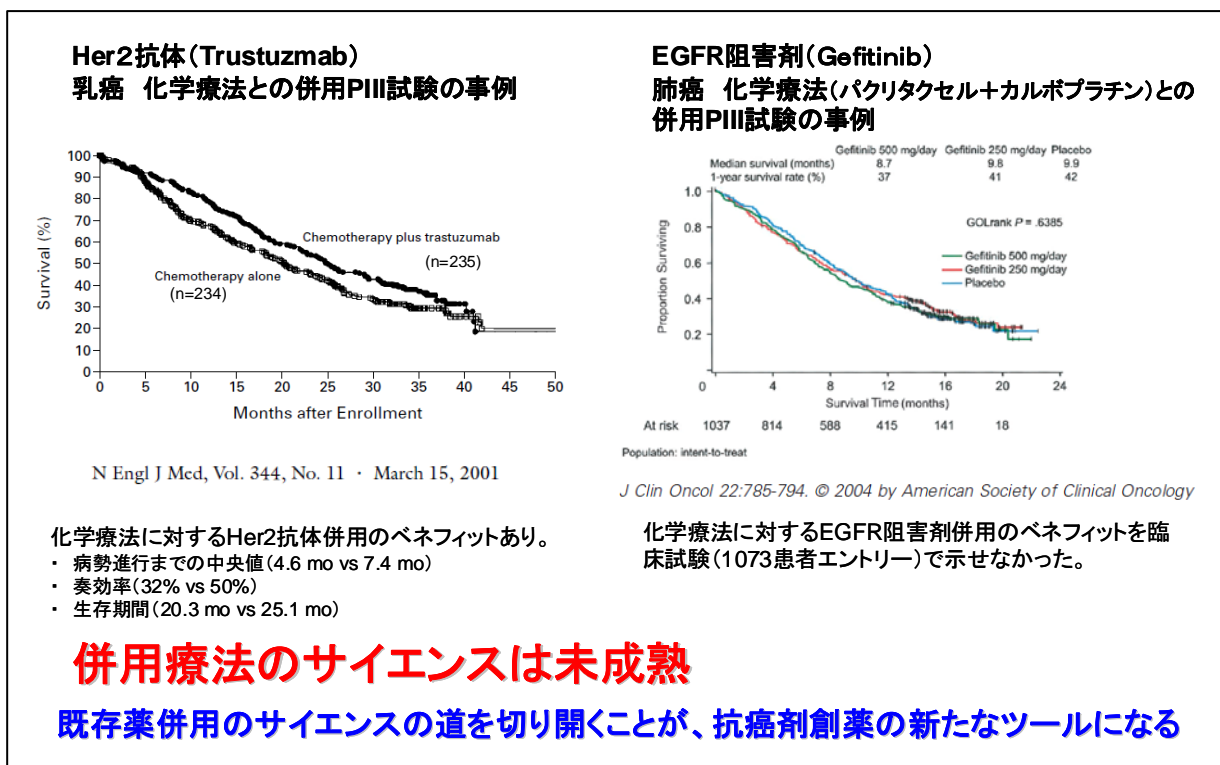
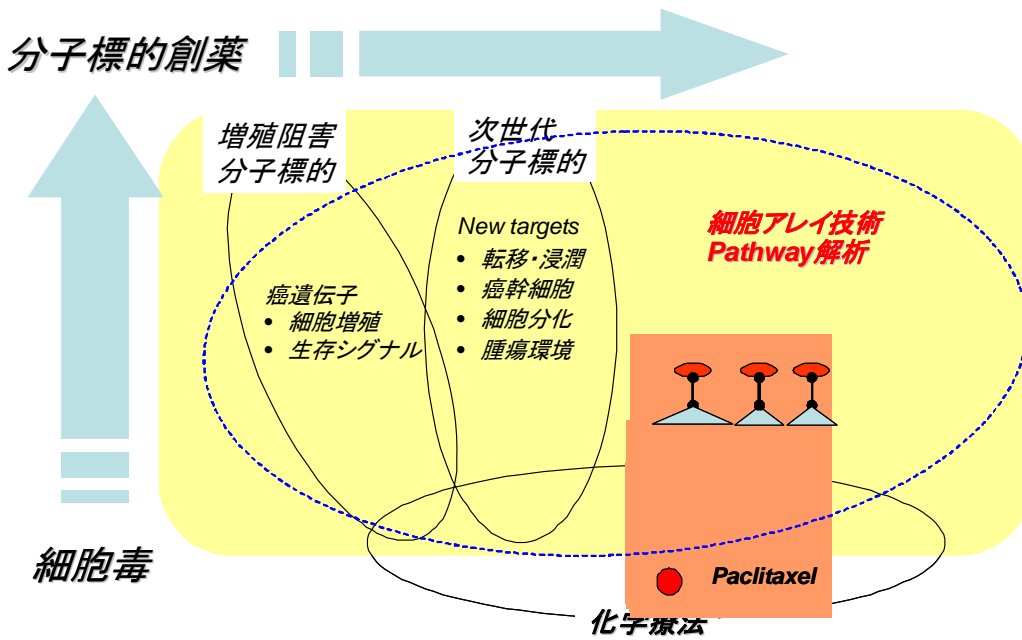


図 4(2)-6 分子標的薬と既存抗がん剤併用療法開発の現状



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

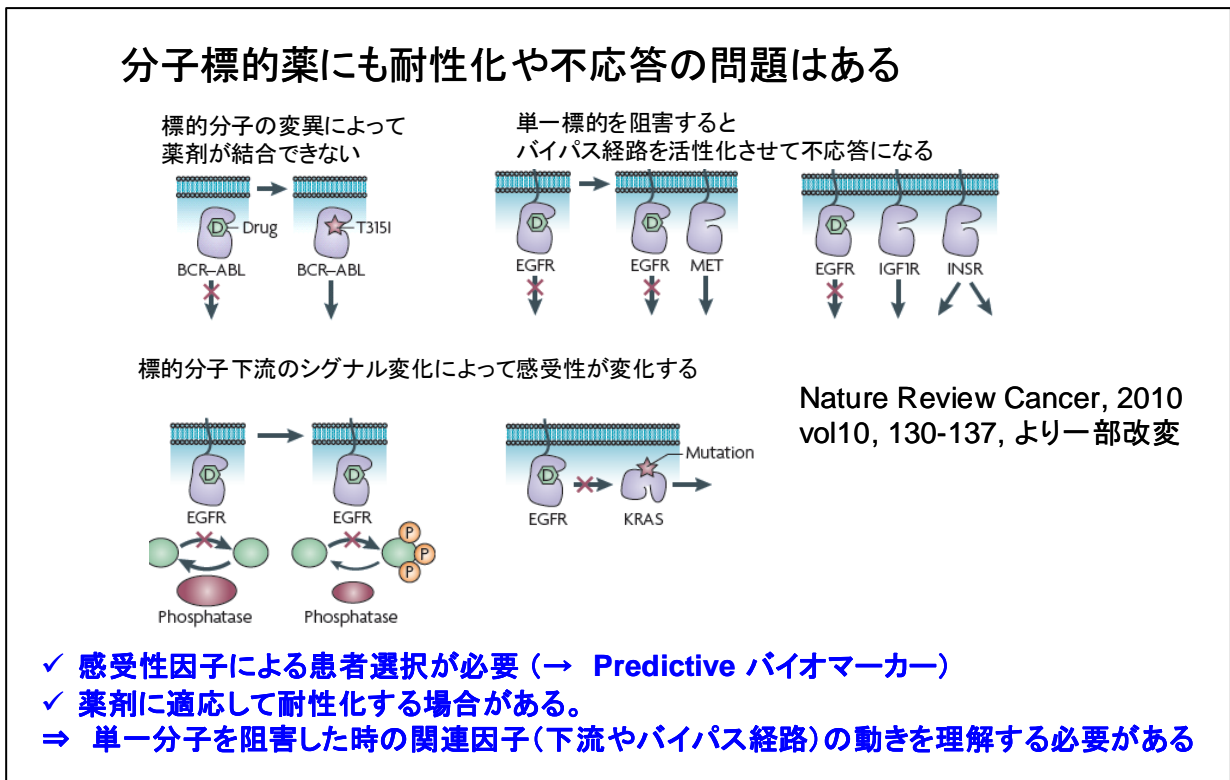


図 4(2)-8 分子標的療法に対する不応答、薬剤耐性

(パクリタキセル感受性遺伝子機能ネットワークの解析)

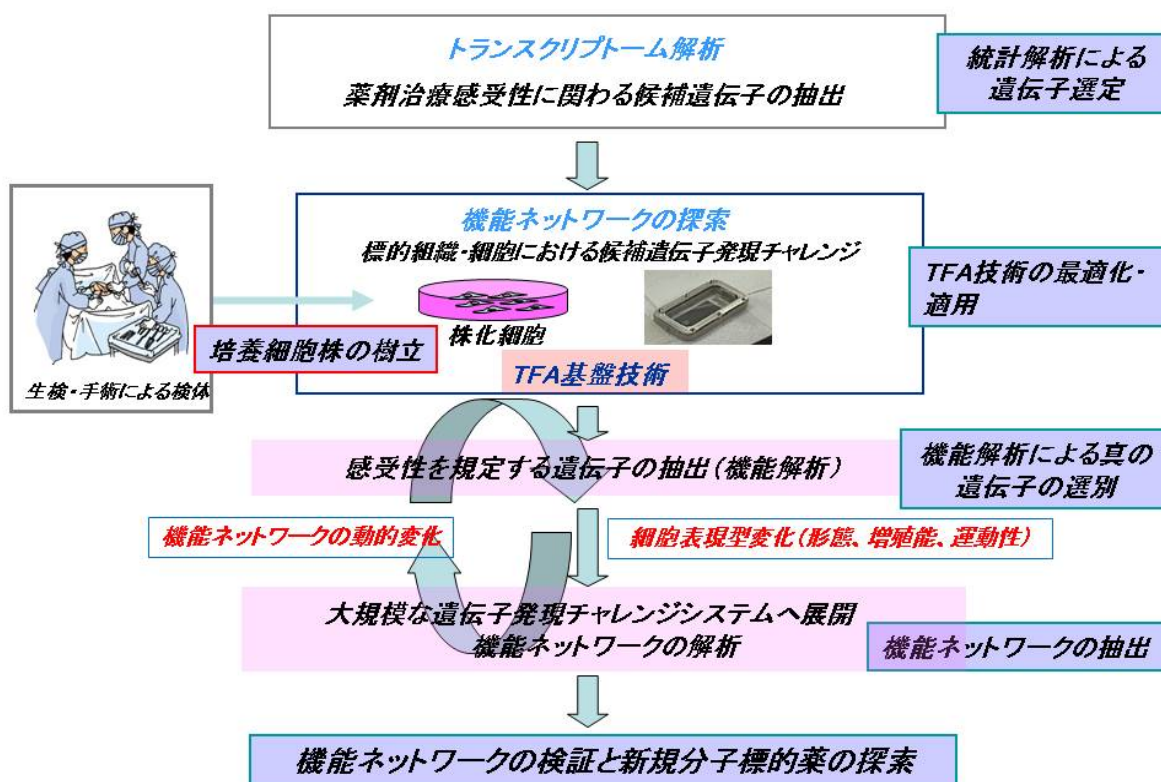


図 4(2)-9 セルアレイを用いた機能ネットワーク検証システム

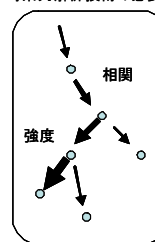
既存薬の効果を増強する併用分子標的創薬への試み

- 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： 80mg/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

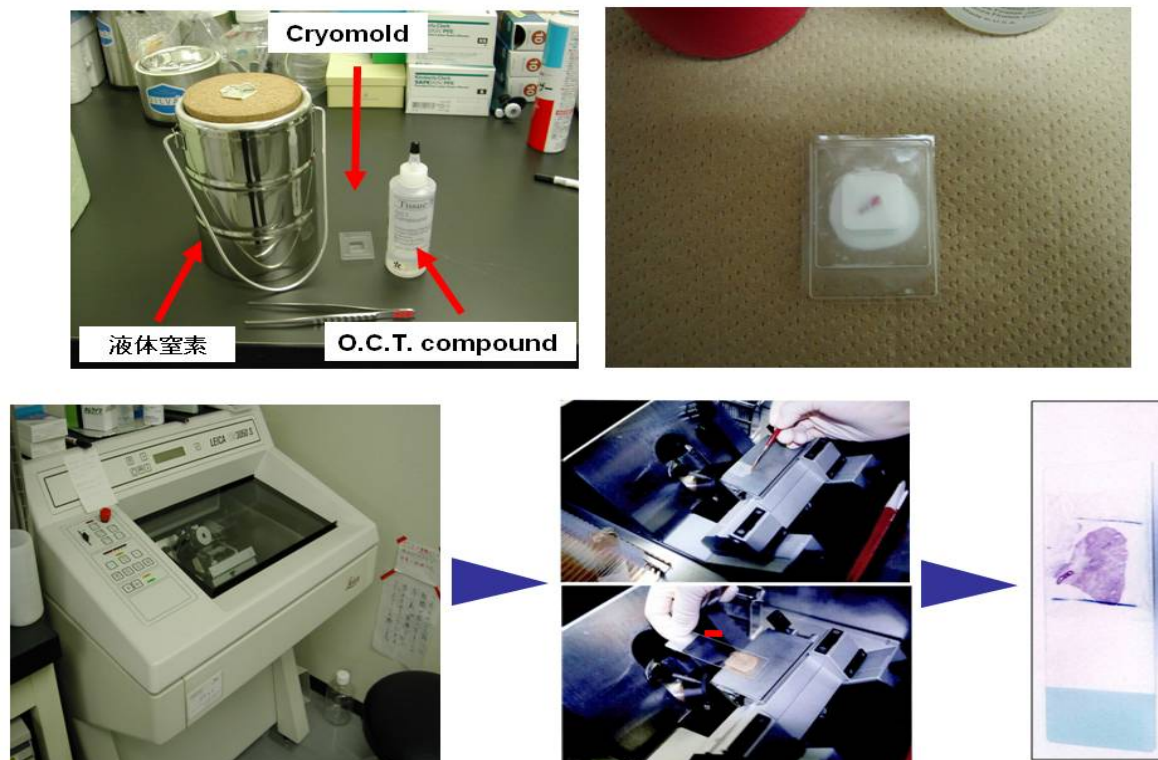
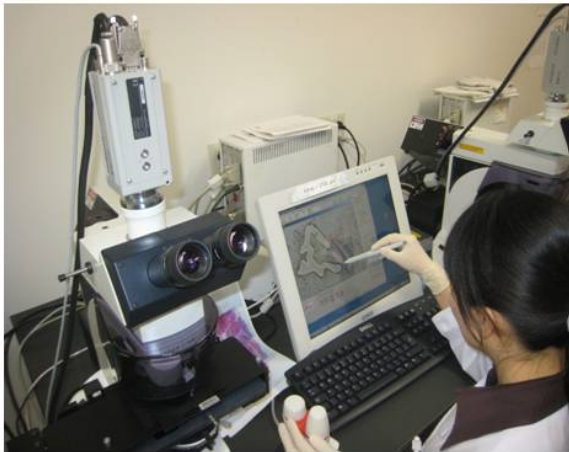
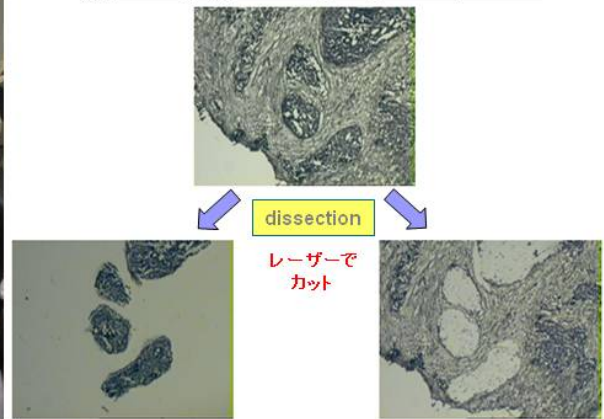


図 4(2)-12 採取した組織の包埋と薄切

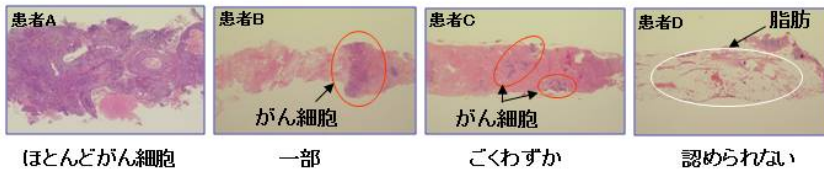


乳がん細胞のマイクロダイゼクション



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

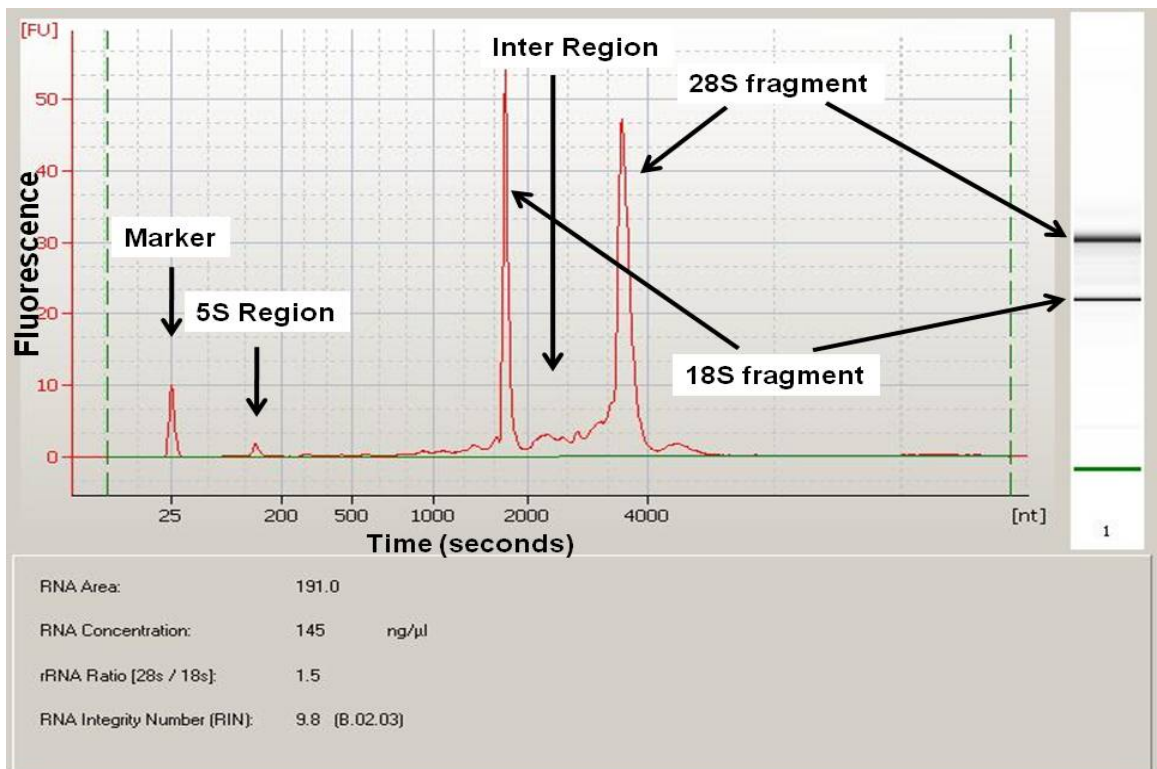


図 4(2)-14 バイオアナライザーによる RNA の質の評価

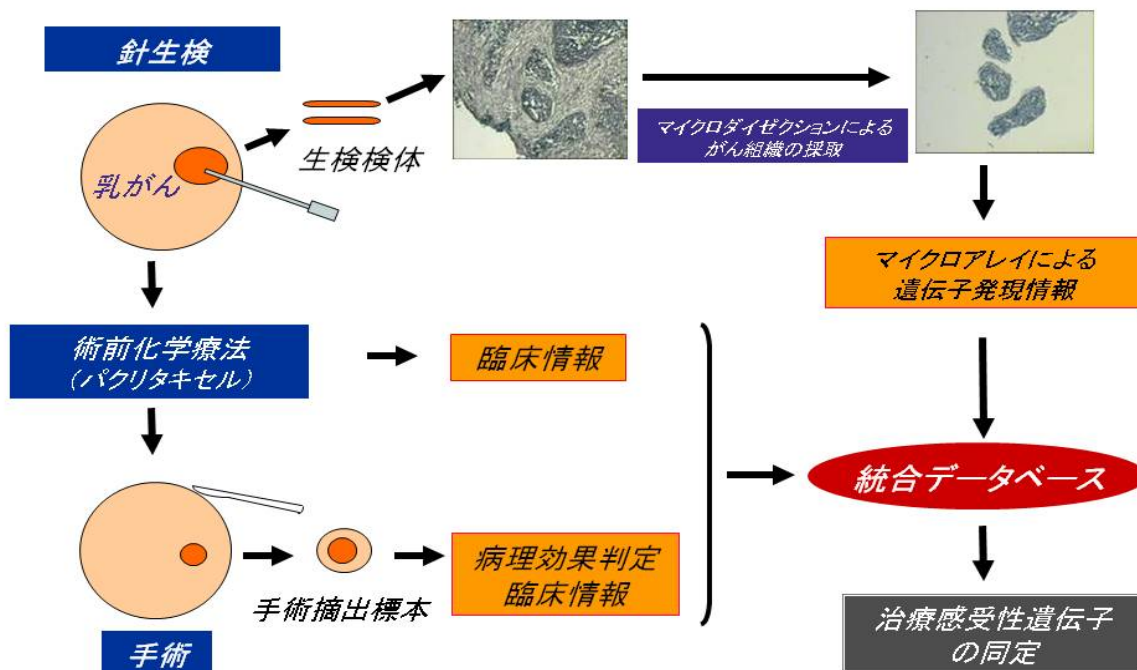


図 4(2)-15 乳がん術前抗がん剤感受性予測に関する臨床試験

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

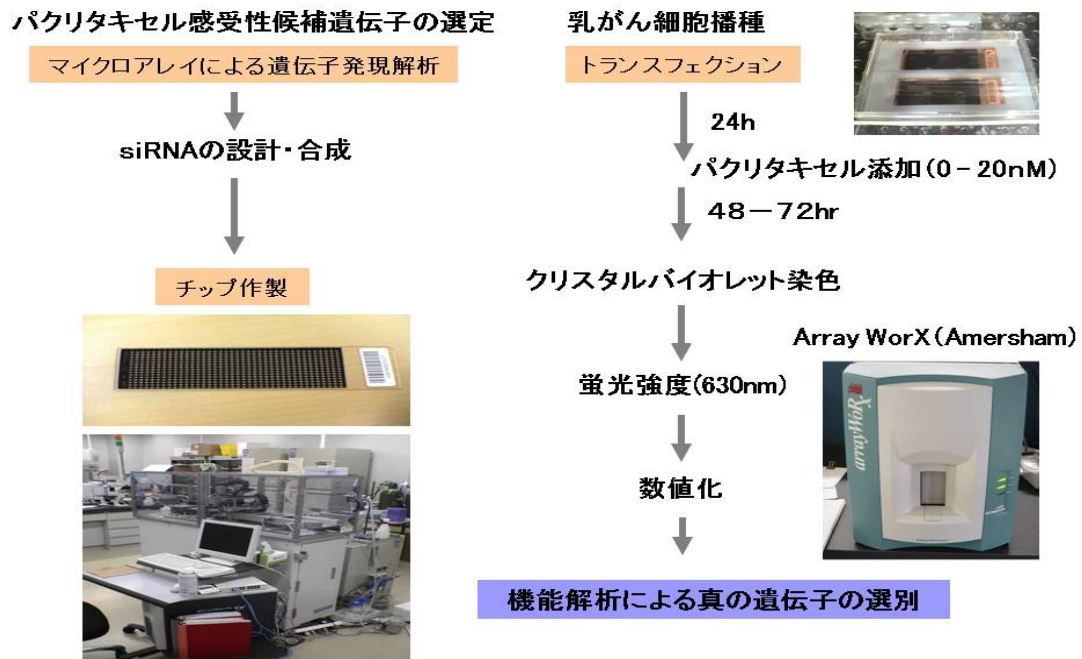


図 4(2)-17 乳がん細胞を用いた抗がん剤感受性遺伝子の発現チャレンジシステム

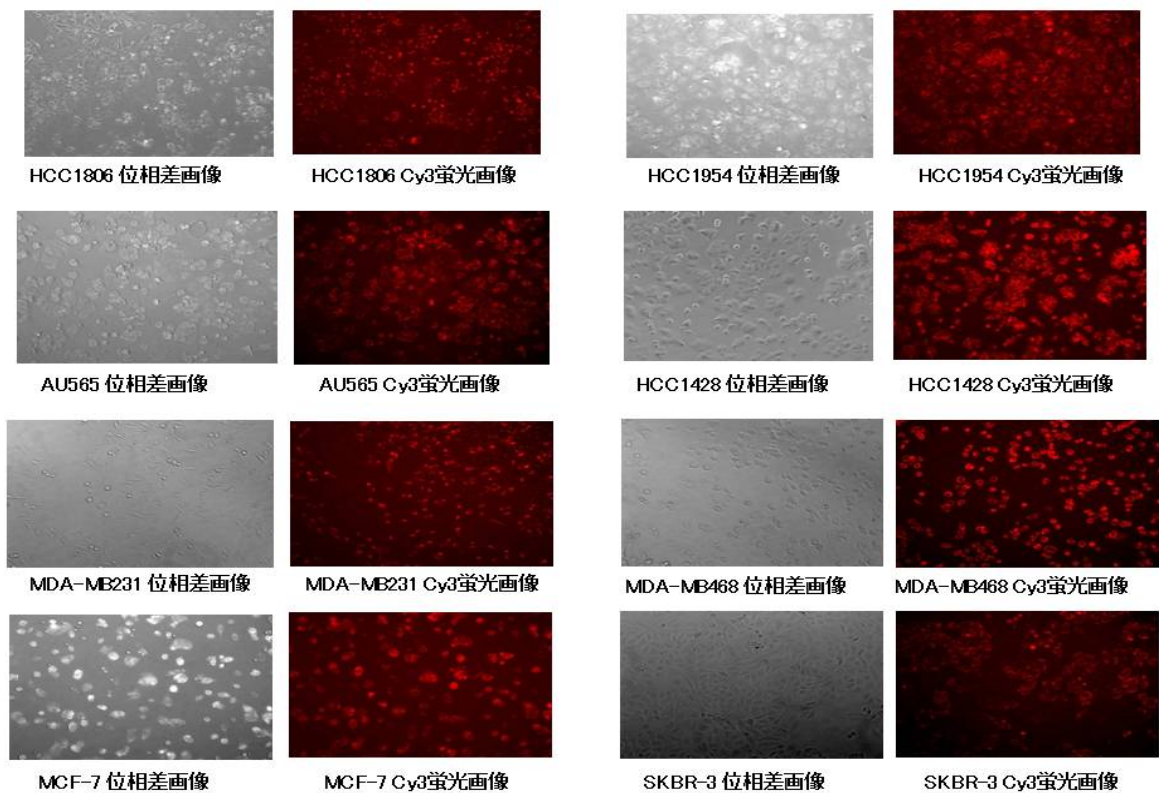


図 4(2)-18 各種乳がん培養細胞株における siRNA の取り込み効率

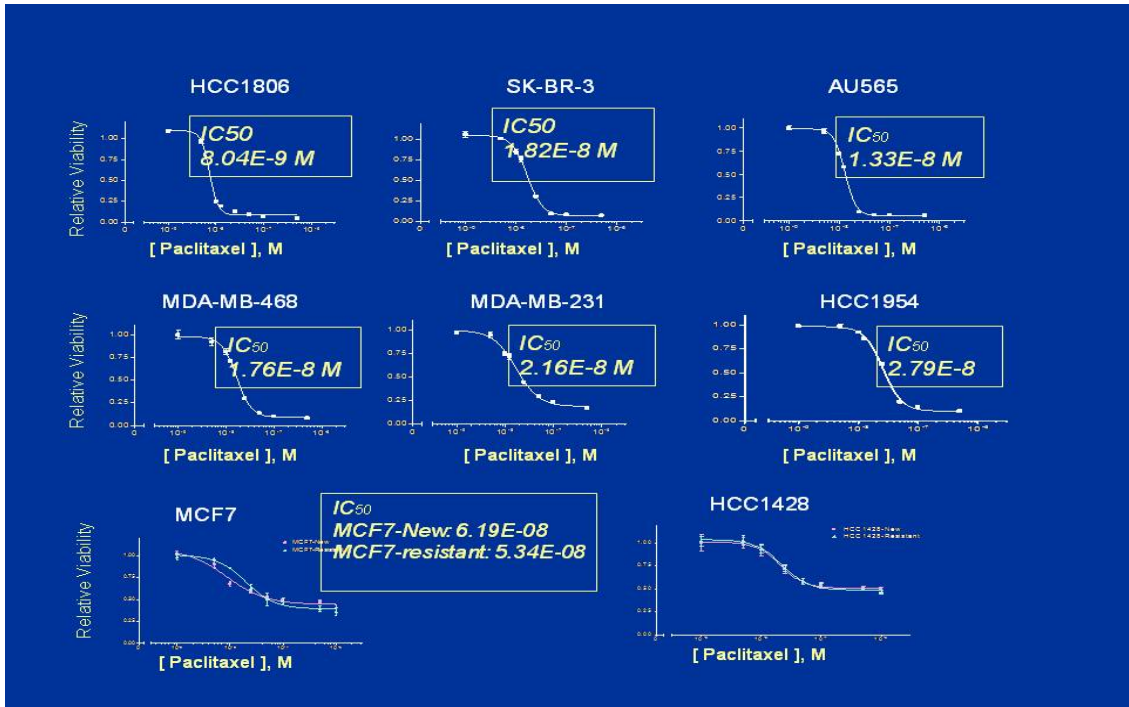


図 4(2)-19 各種乳がん培養細胞におけるパクリタキセル感受性

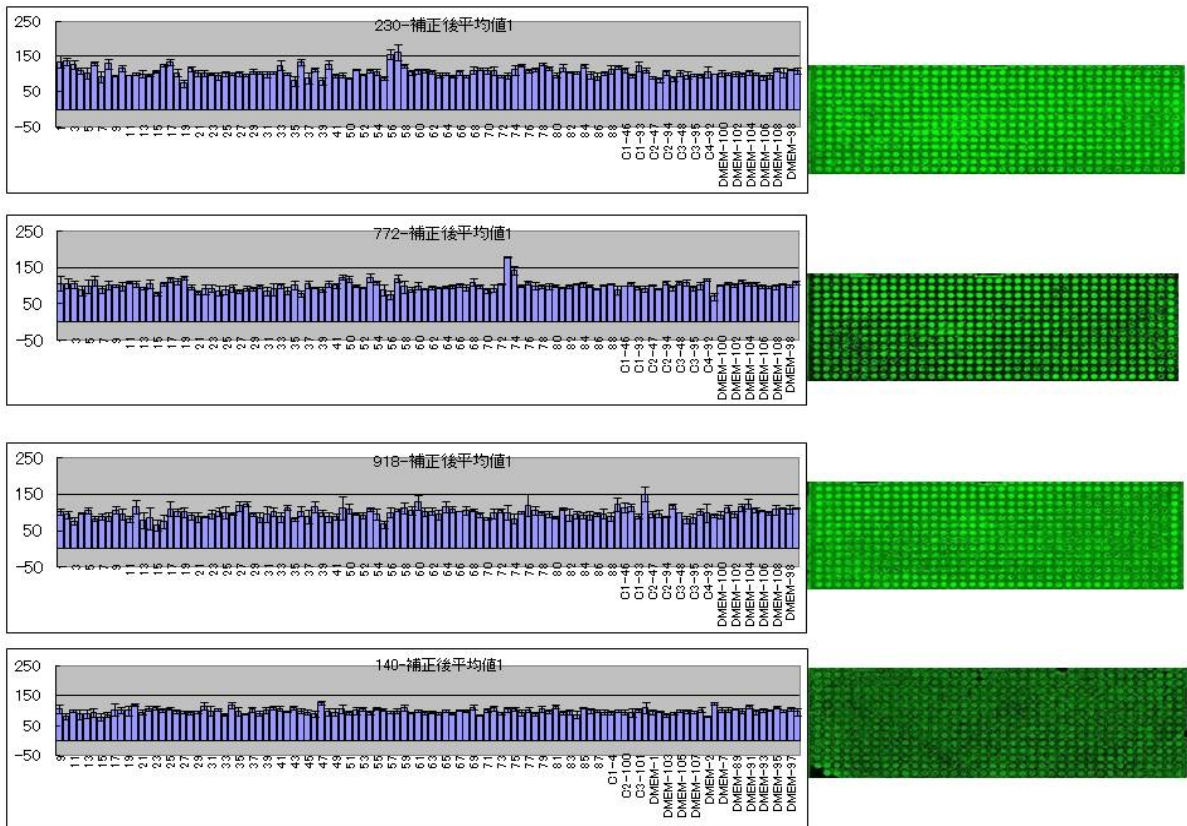


図 4(2)-20 セルアレイ解析による細胞生存率の測定

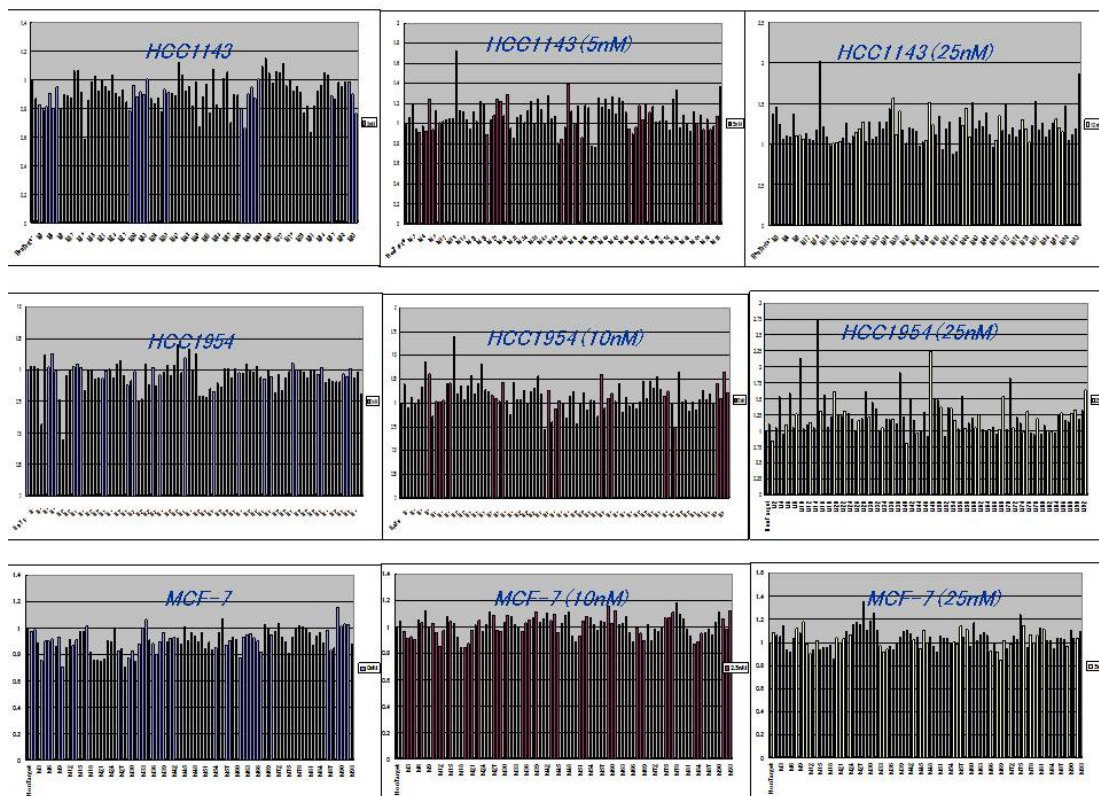


図 4(2)-21 細胞の生死への遺伝子ノックダウンの影響

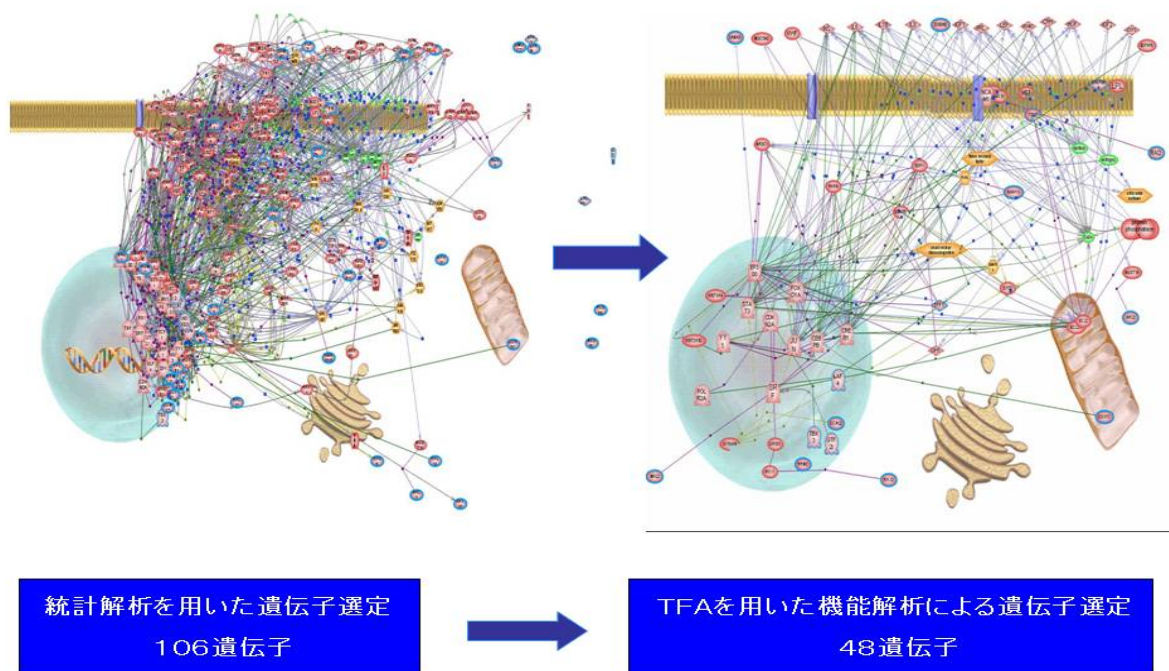


図 4(2)-22 候補遺伝子のネットワーク解析

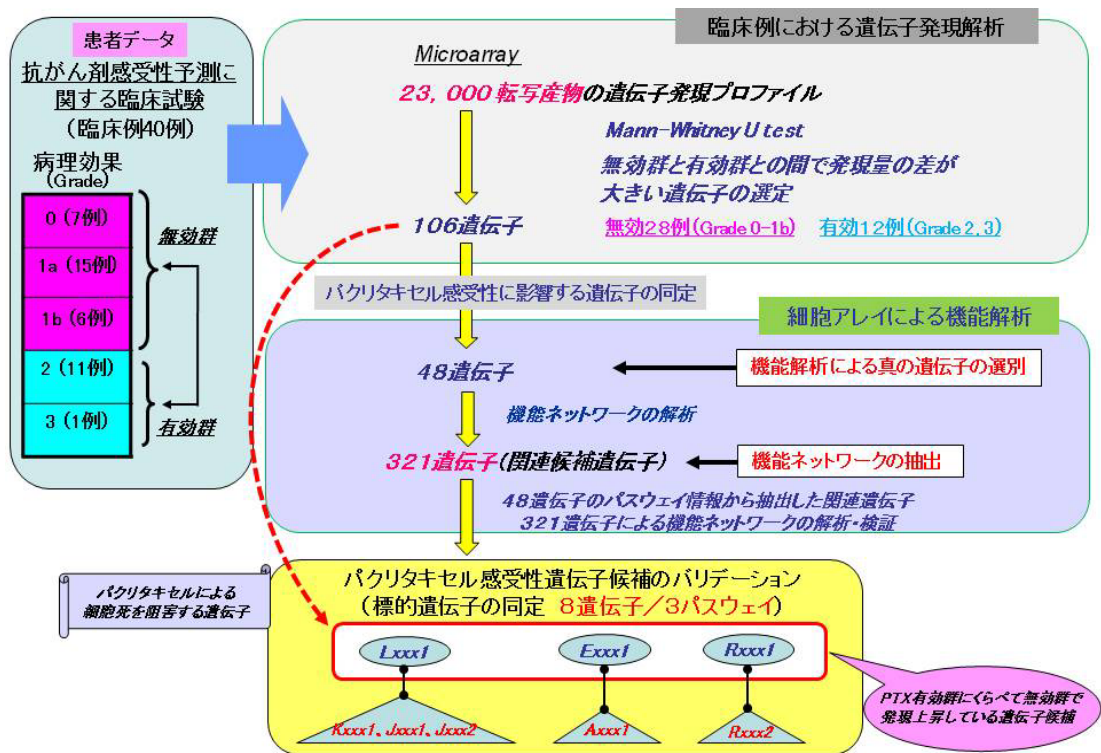


図 4(2)-23 パクリタキセル感受性遺伝子の同定

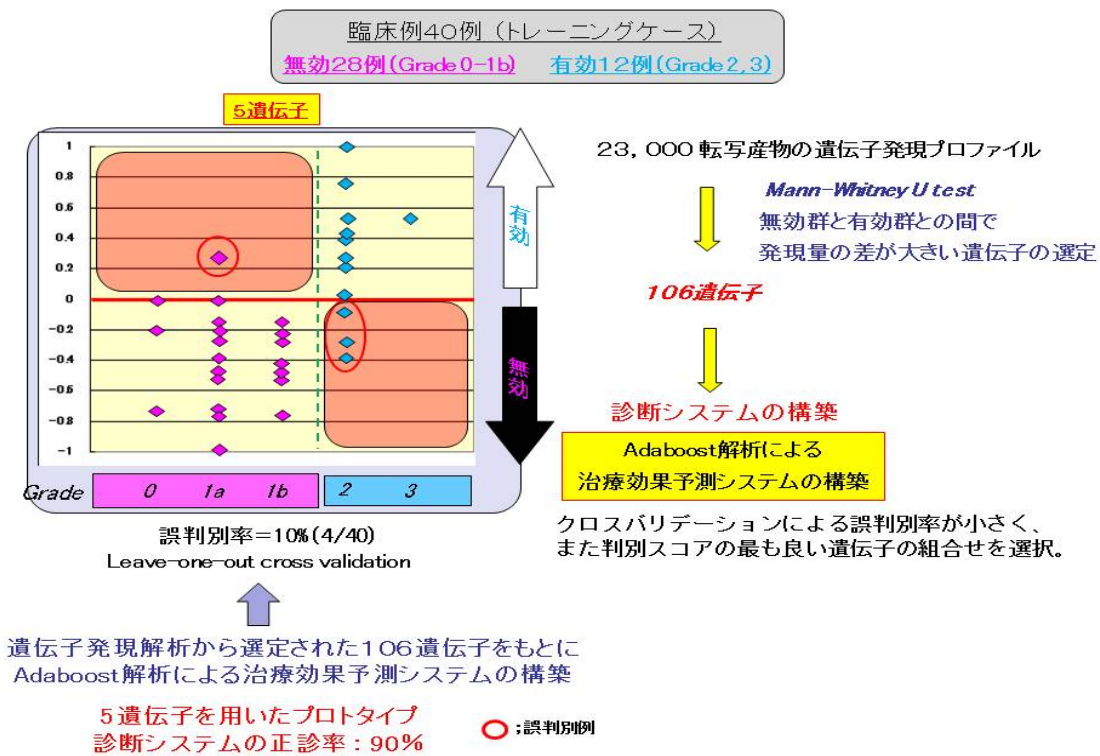


図 4(2)-24 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (従来法)

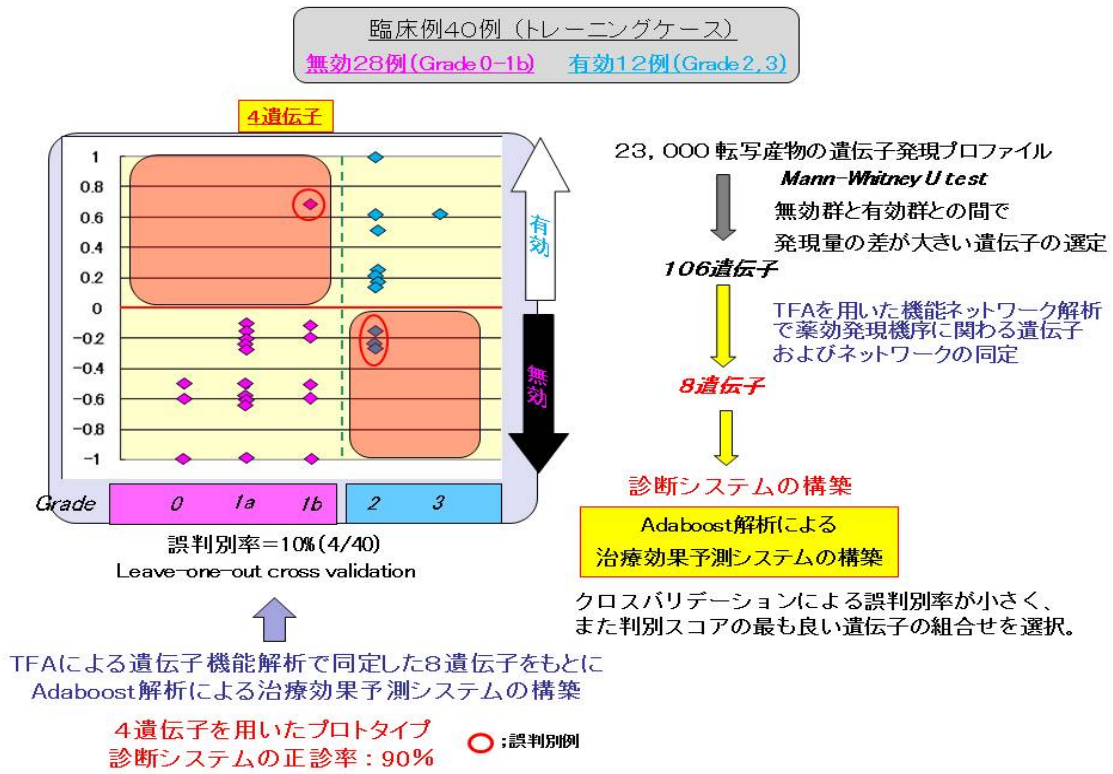


図 4(2)-25 パクリタキセル治療効果予測システムの構築 (セルアレイ解析による遺伝子)

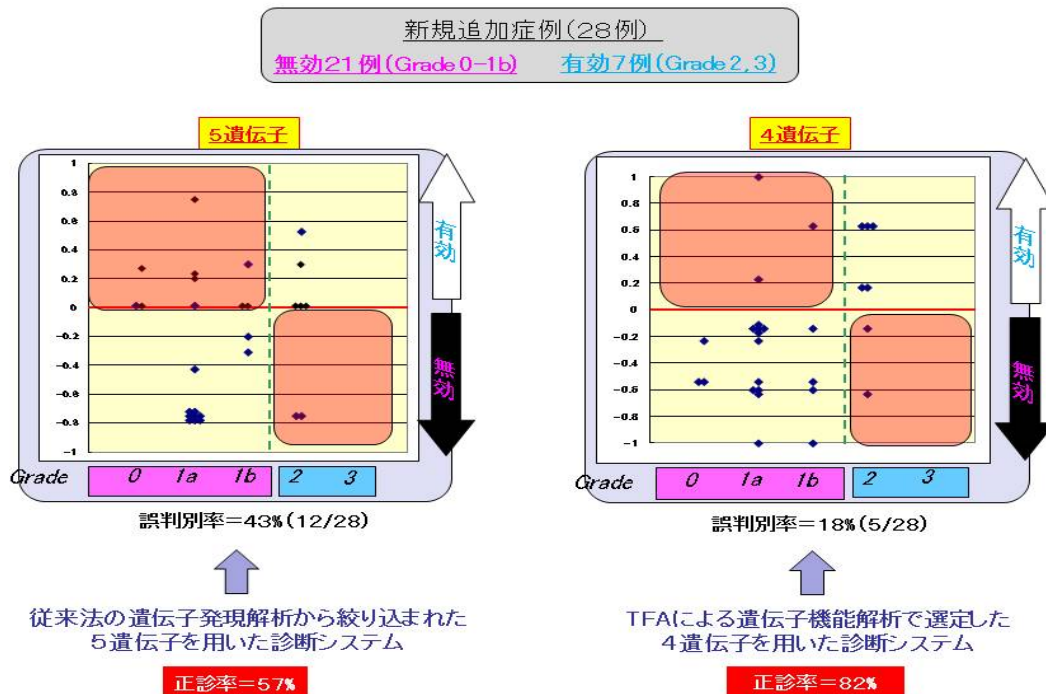


図 4(2)-26 パクリタキセル治療効果予測システムの検証

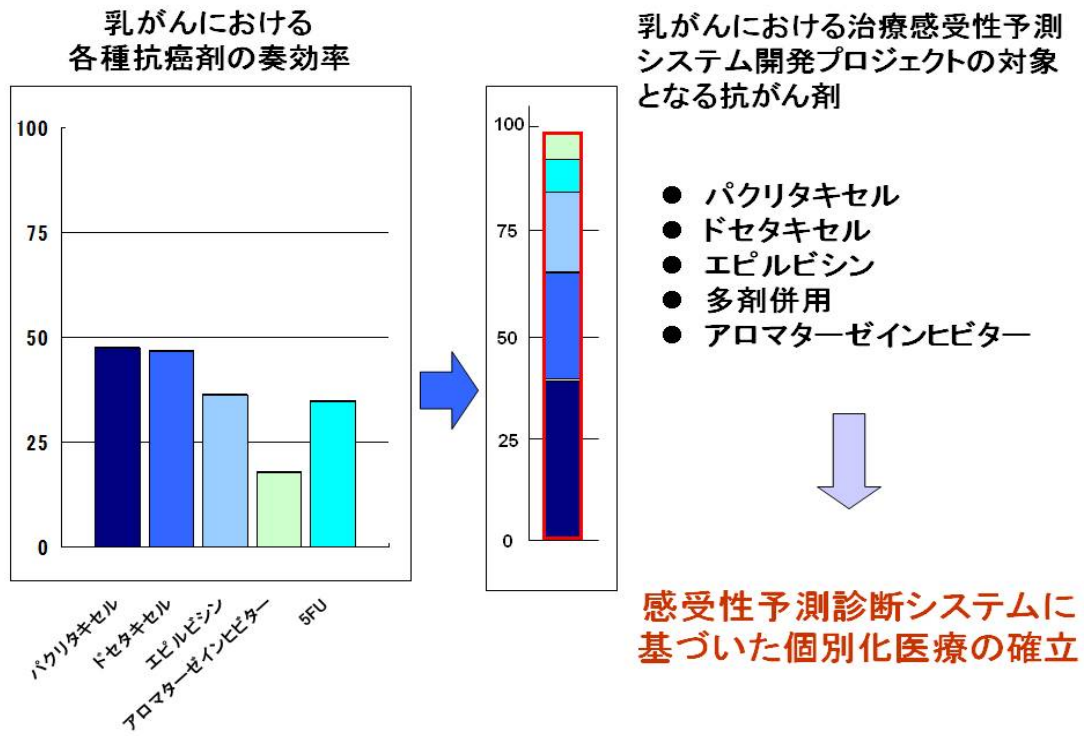


図 4(2)-27 がんの個性に基づいた最も有効な抗がん剤の選択を可能にするシステムの構築

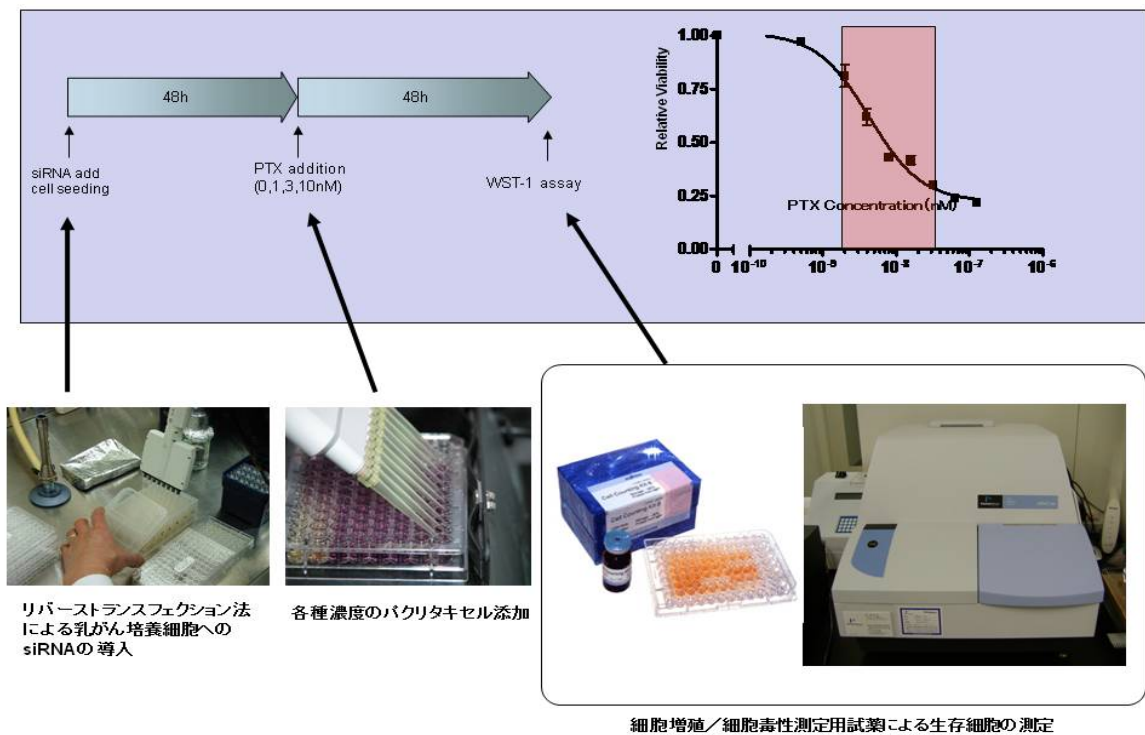


図 4(2)-28 ウェルベース (96 穴プレート) を用いた検証実験

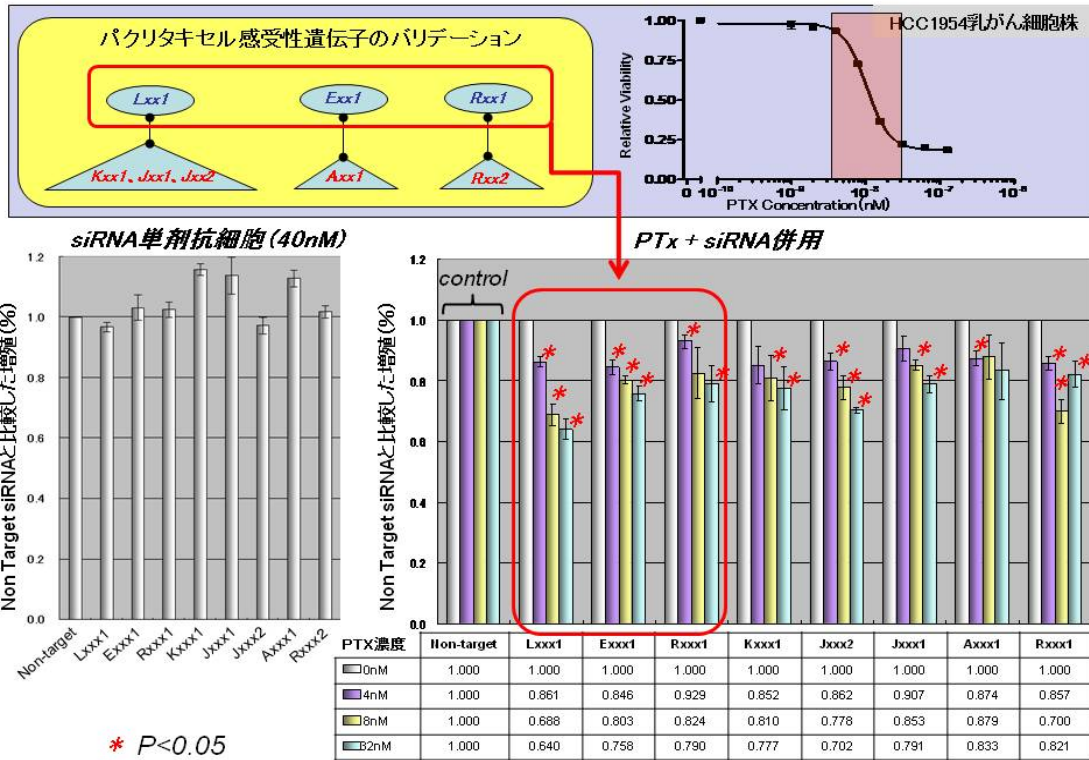


図 4(2)-29 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (1)

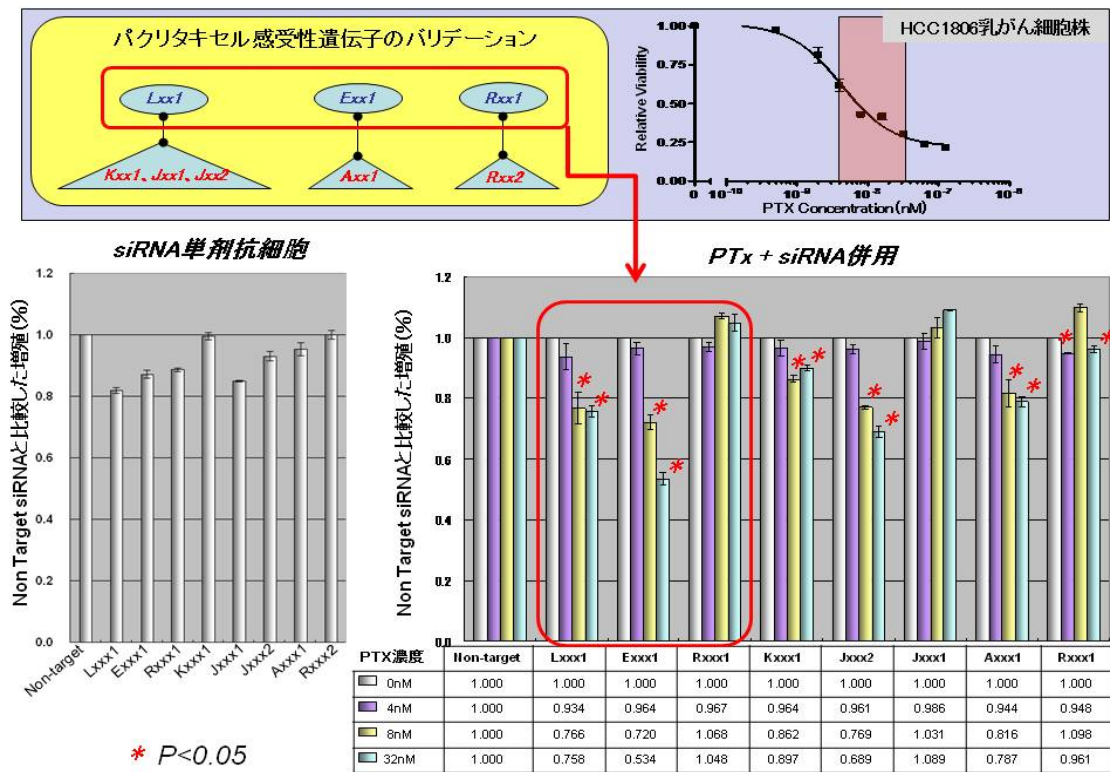


図 4(2)-30 パクリタキセルによる細胞死を阻害する遺伝子の検証 (2)

— HCC1954乳がん細胞株—

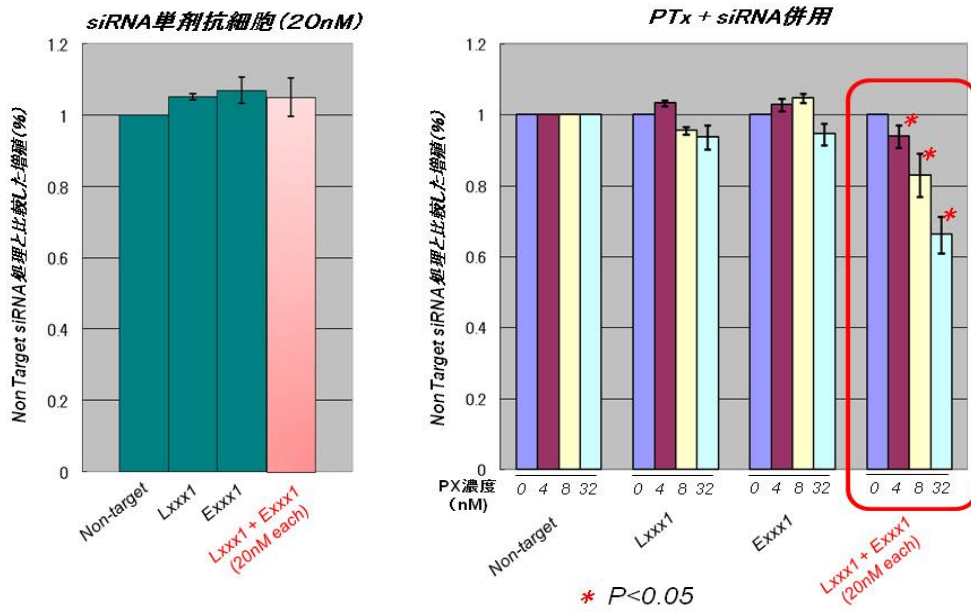


図 4(2)-31 複数パスウェイの組み合わせ阻害によるパクリタキセル感受性増強効果の検証

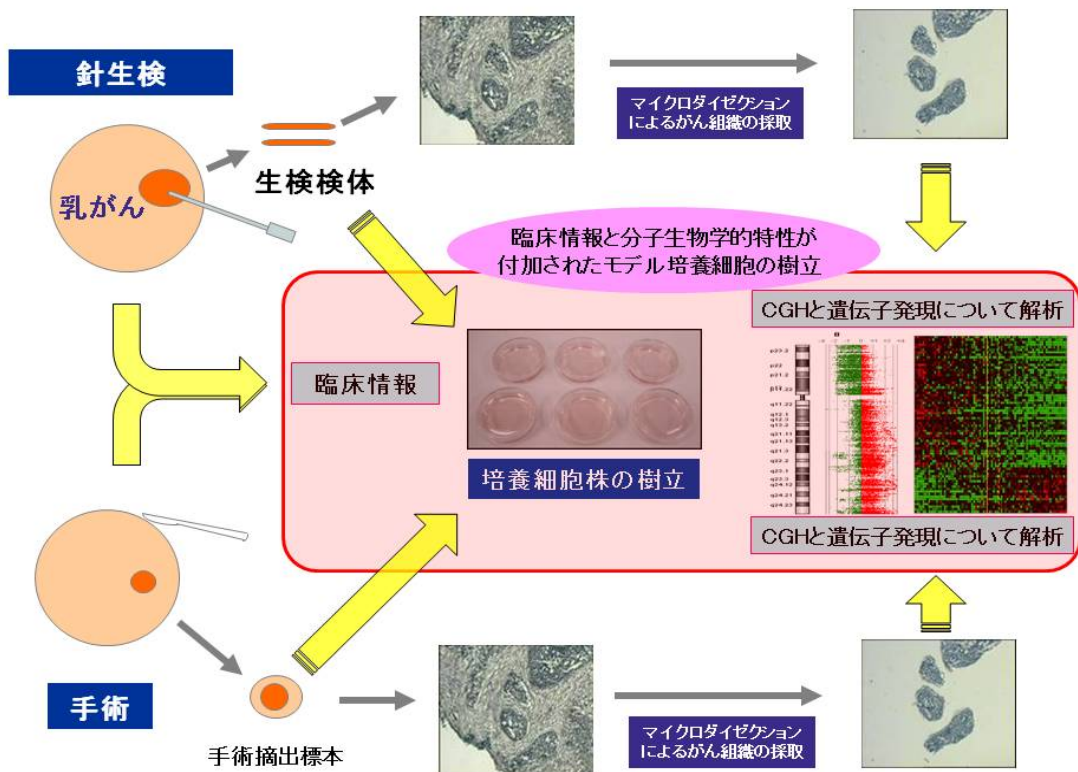
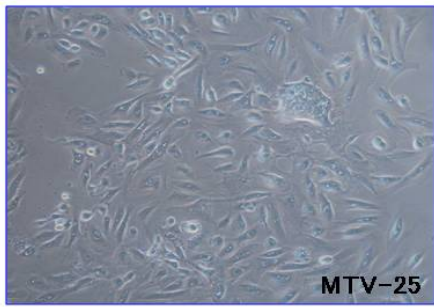
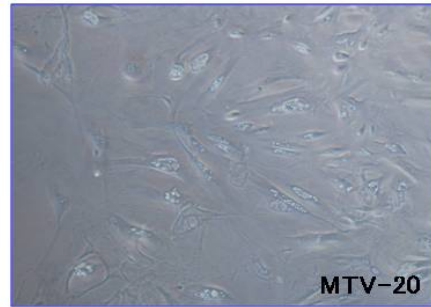


図 4(2)-32 乳がん培養細胞株の樹立

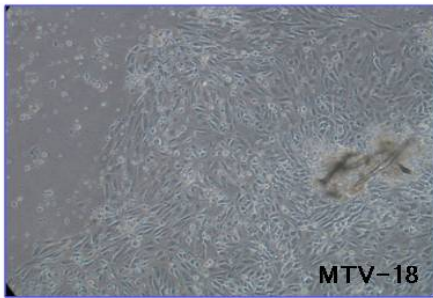
乳がん培養細胞株(MTV-25/10日目)



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)

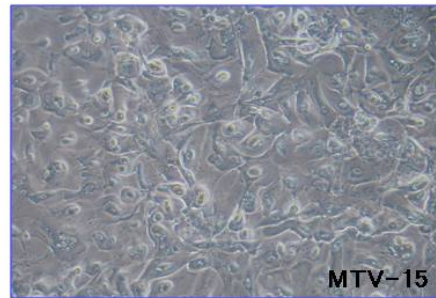
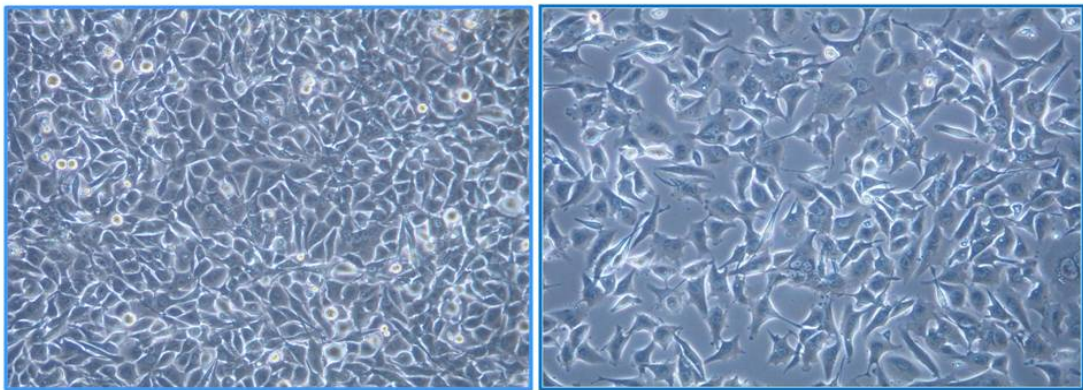


図 4(2)-33 針生検サンプルからの初代培養細胞



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

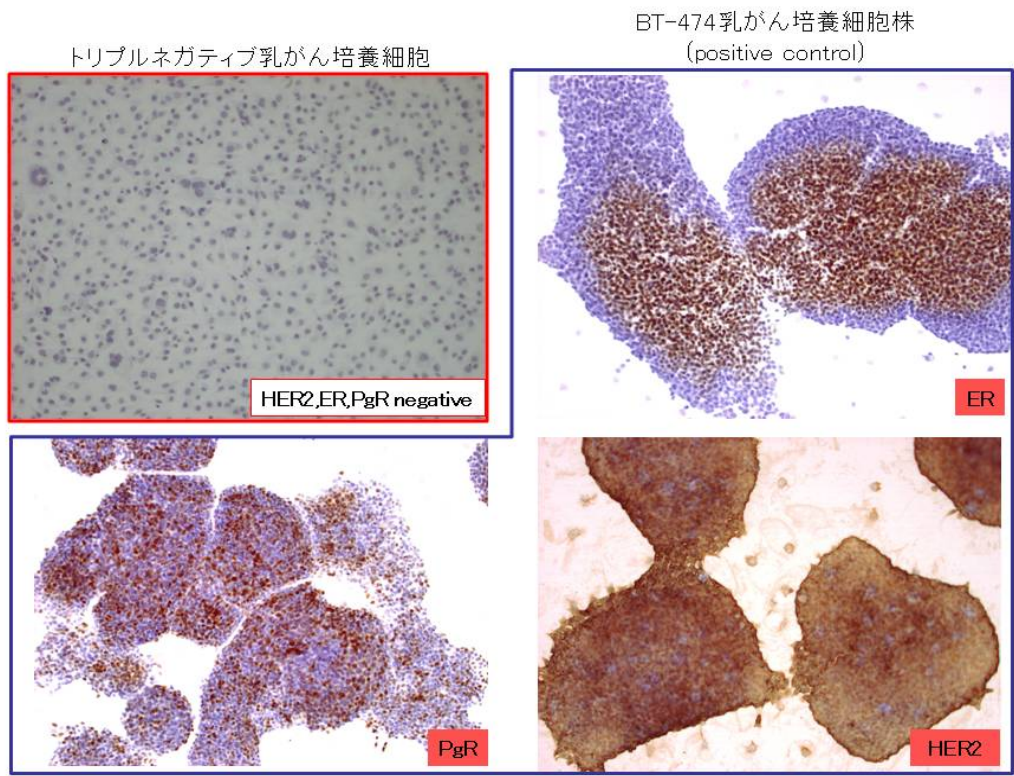


図 4(2)-35 トリプルネガティブ乳がん培養細胞株 (免疫染色)

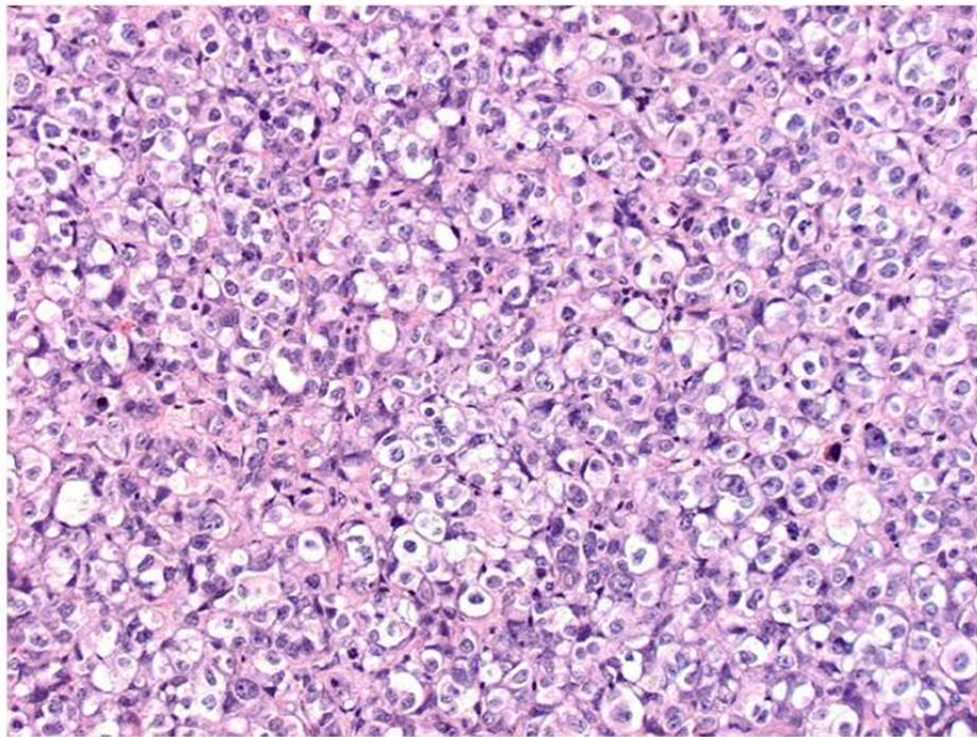
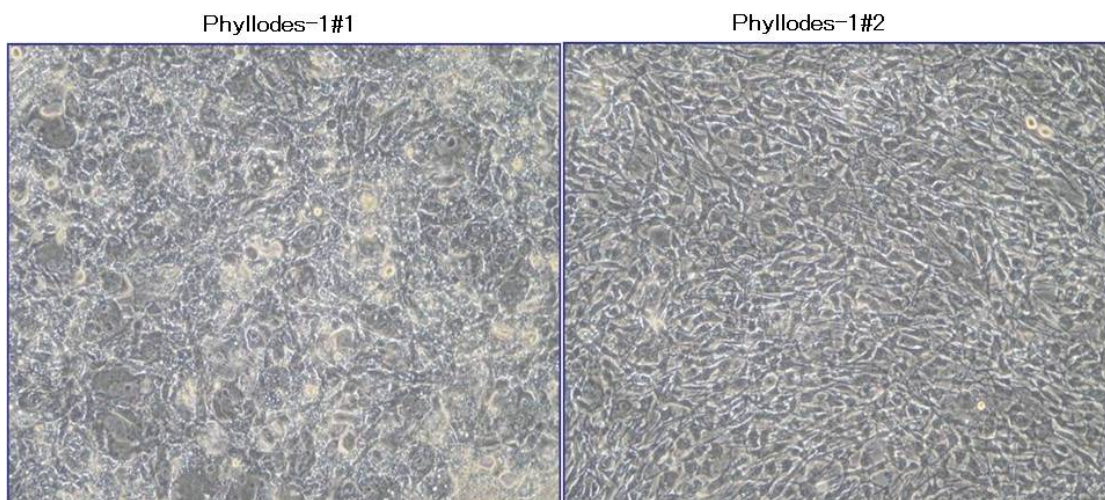


図 4(2)-36 トリプルネガティブ乳がんの SCID マウス移植組織像

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)

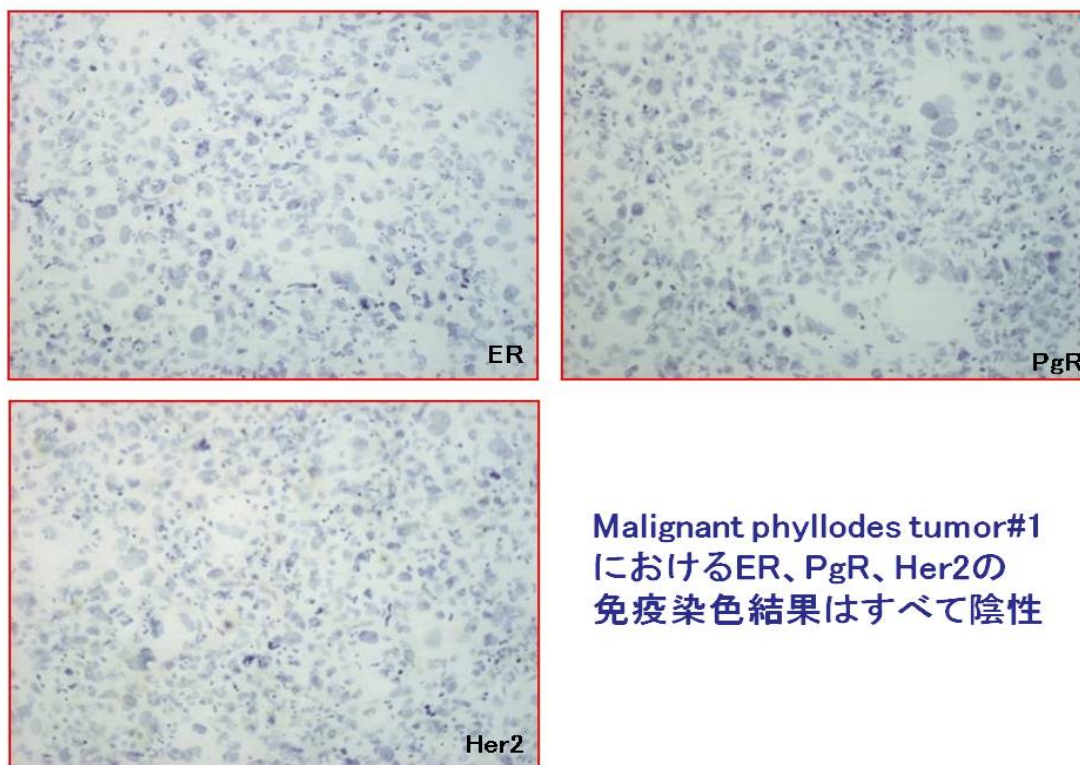


図 4(2)-38 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (1)

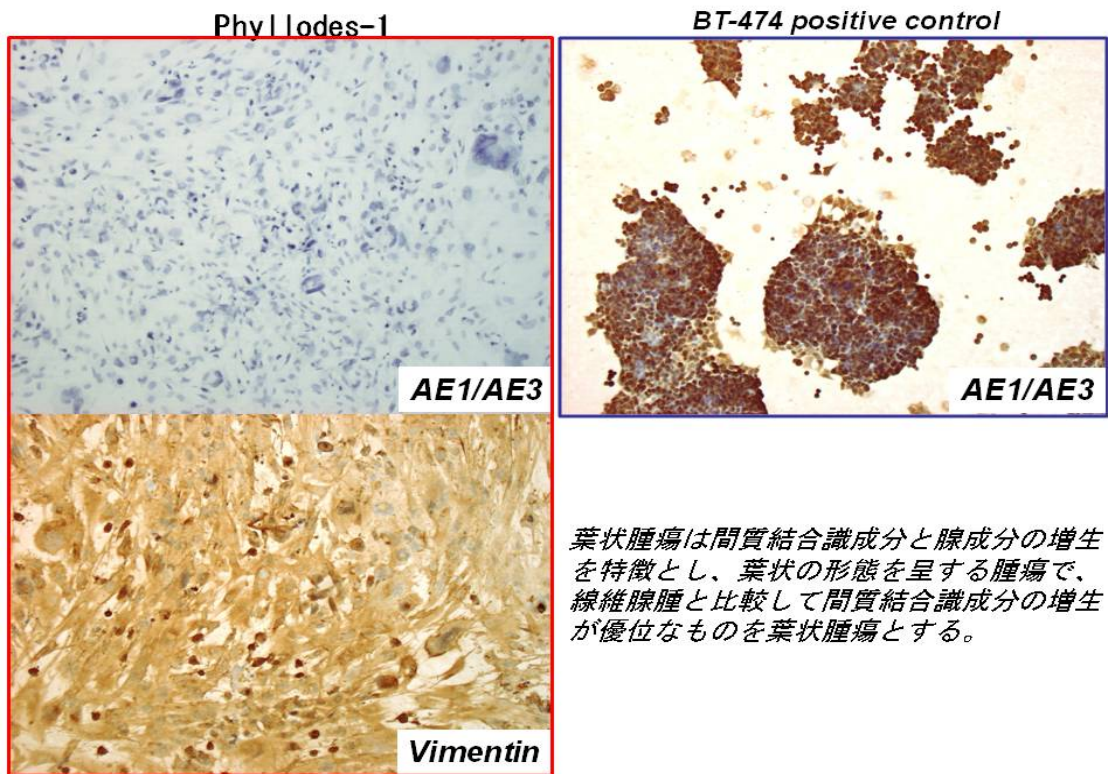
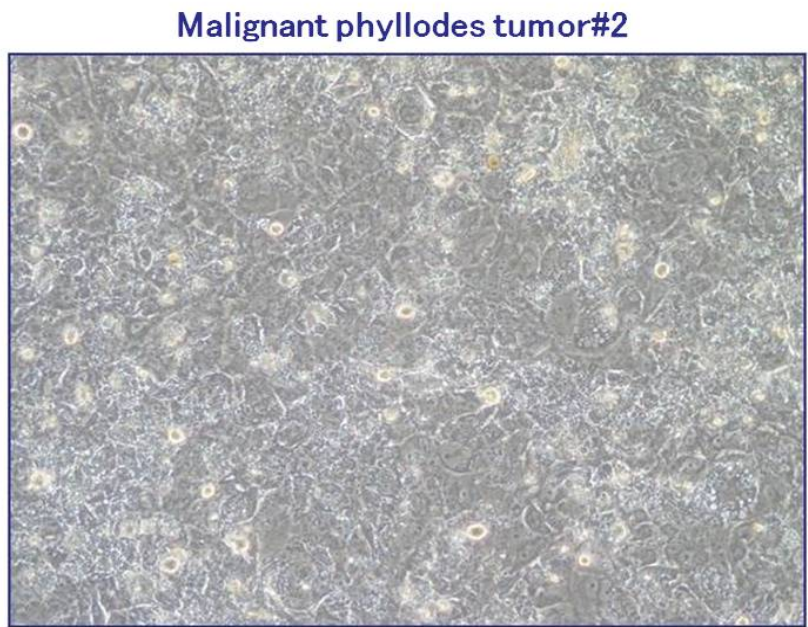


図 4(2)-39 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色（1）



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）

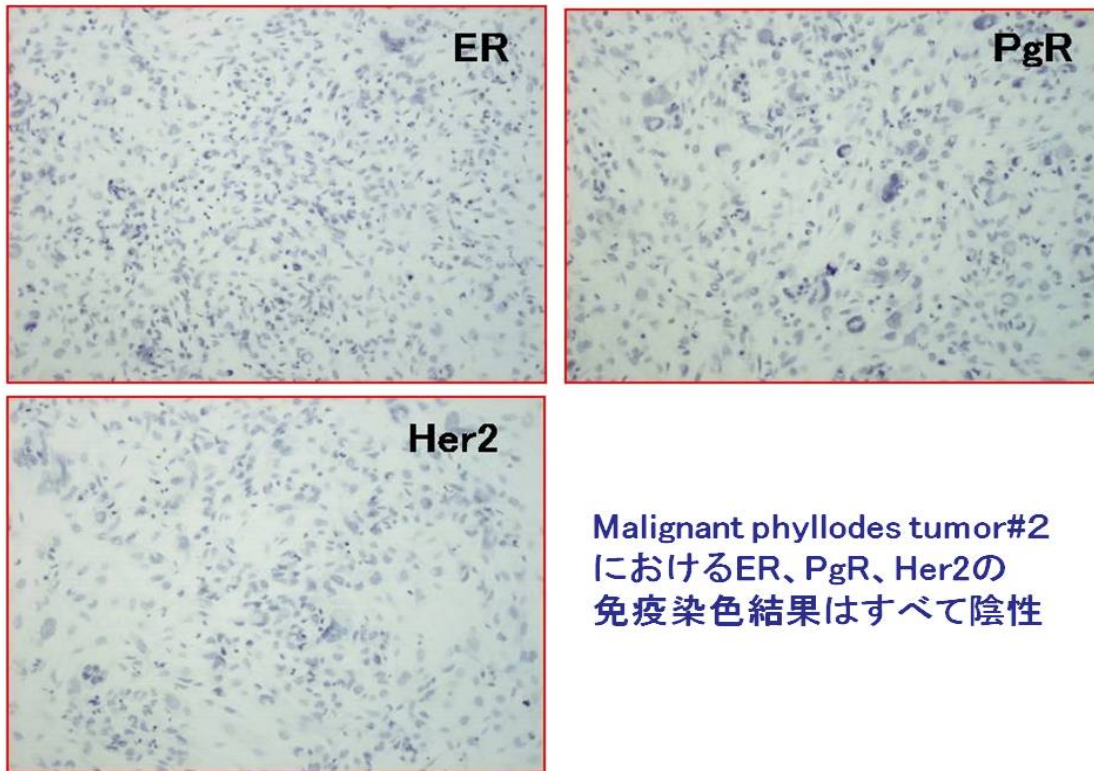


図 4(2)-41 葉状腫瘍培養細胞株におけるホルモンレセプターの免疫染色 (2)

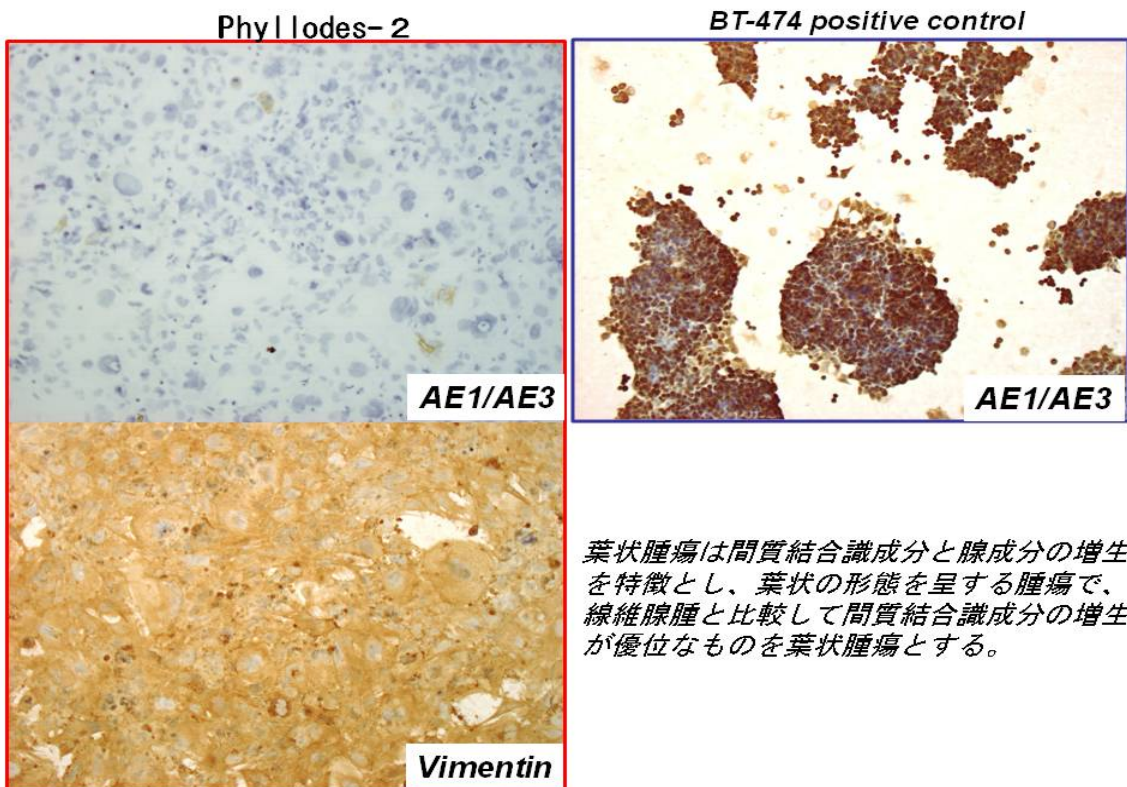


図 4(2)-42 葉状腫瘍培養細胞株における上皮マーカーの免疫染色 (2)

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

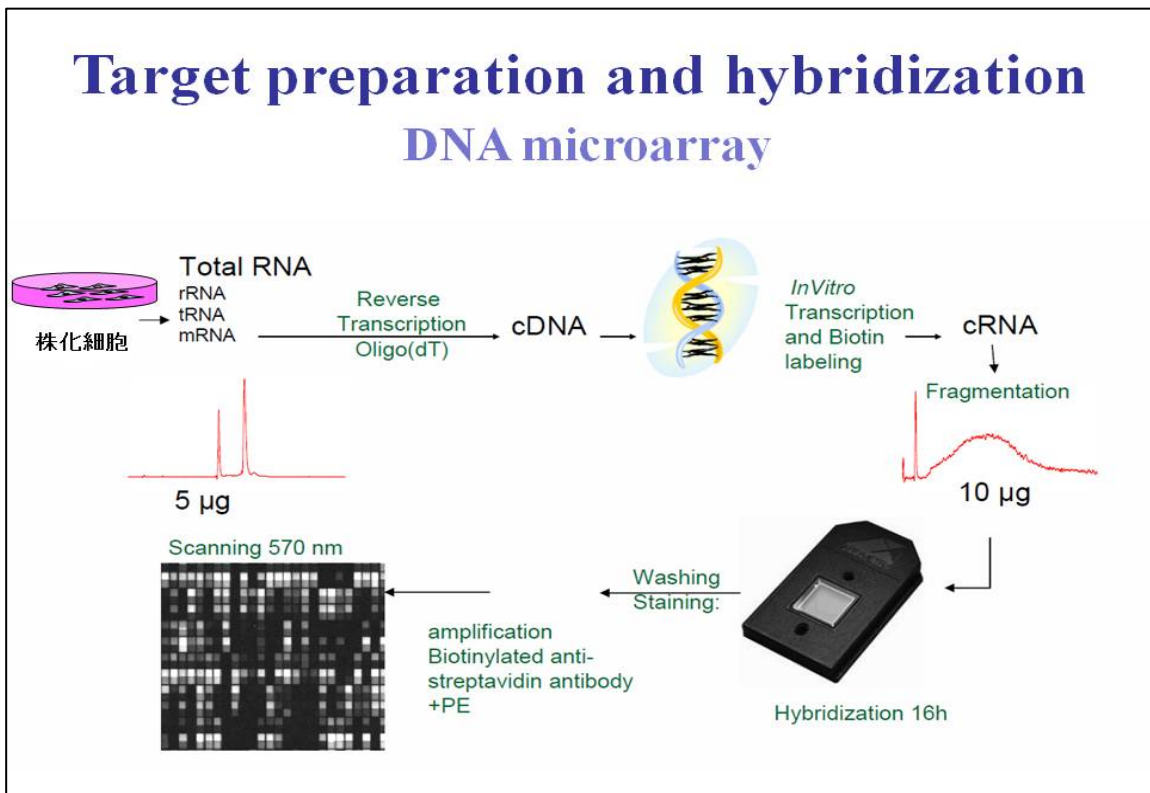


図 4(2)-44 樹立した培養細胞の遺伝子発現解析

—乳がん培養細胞株HBC11(トリプルネガティブ乳がん)—

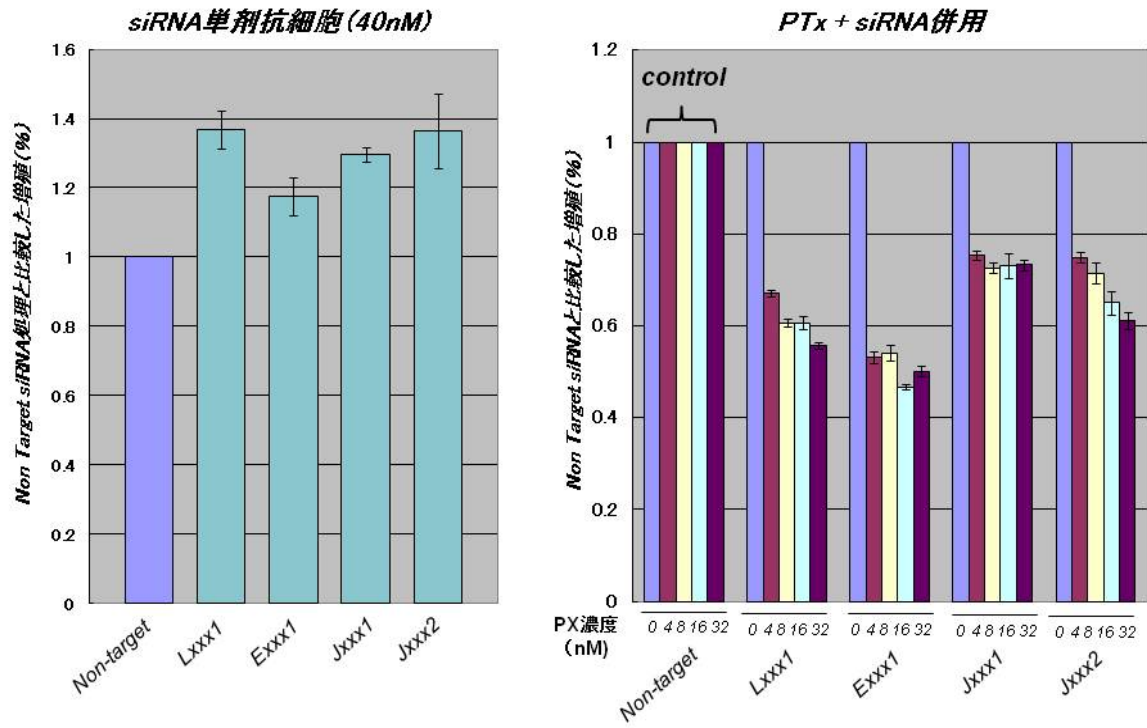


図 4(2)-45 樹立した培養細胞におけるパクリタキセル感受性規定遺伝子の検証

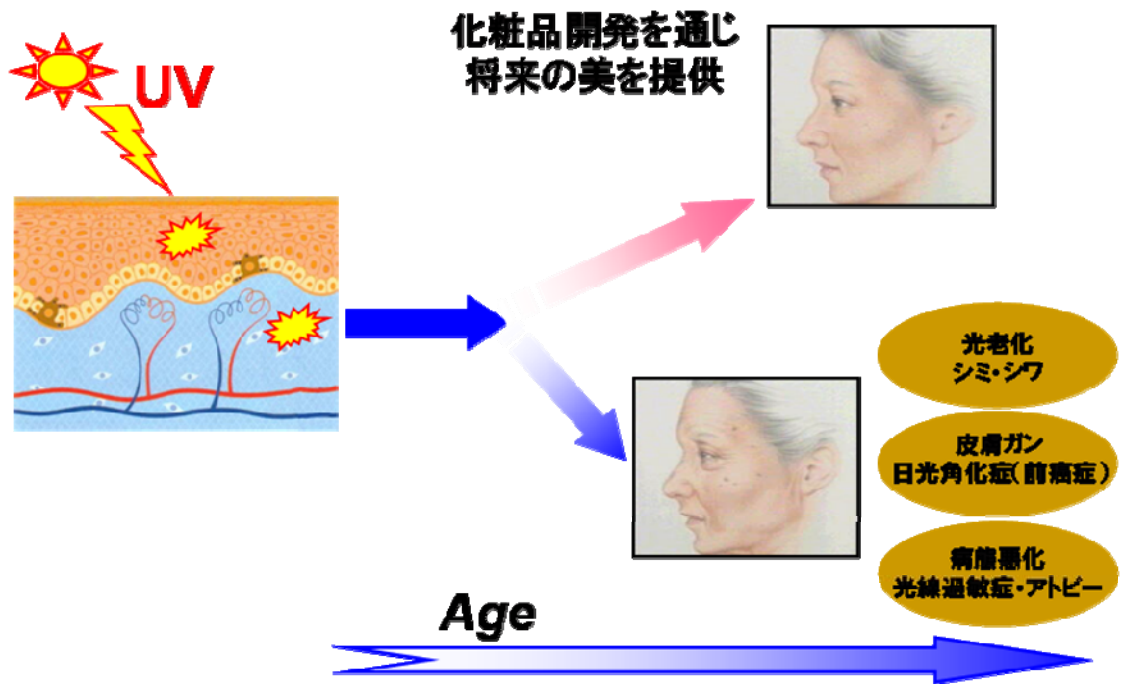


図 4(3)-1 紫外線は皮膚老化を加速させる最大の環境要因

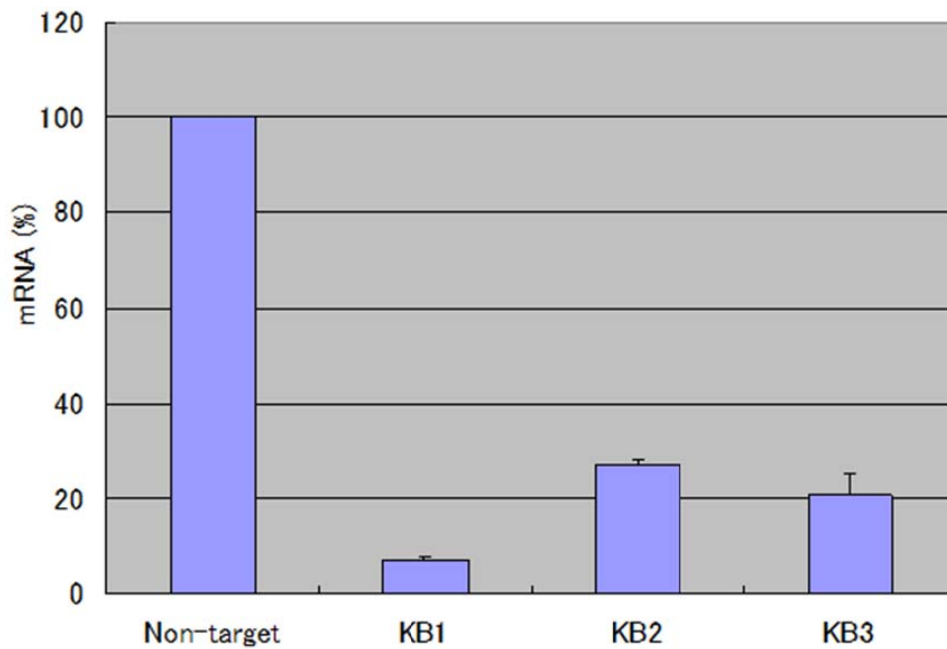


図 4(3)-2 KB 遺伝子の RNA 干渉による発現抑制

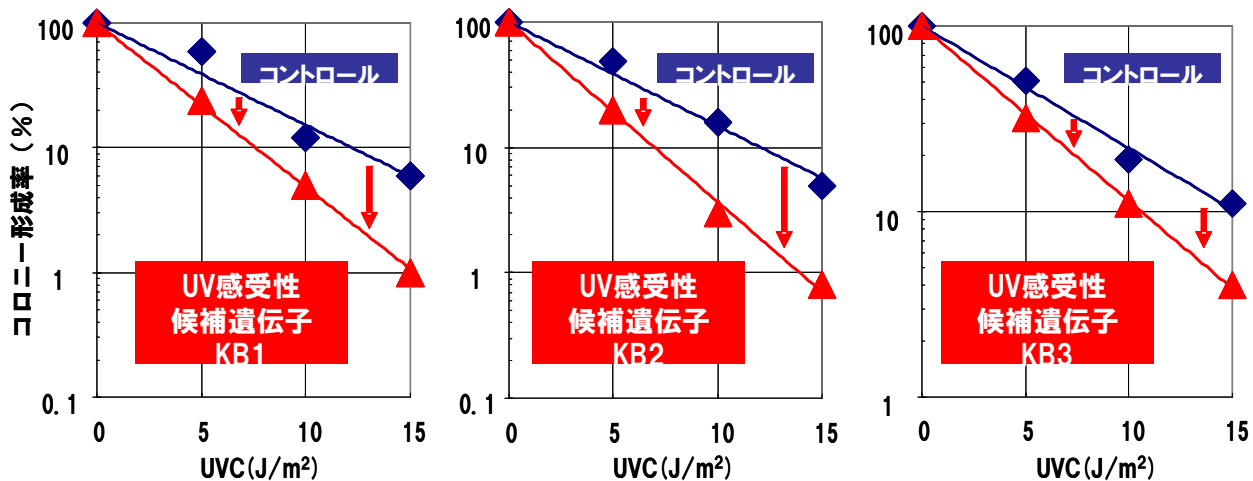


図 4(3)-3 KB 遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

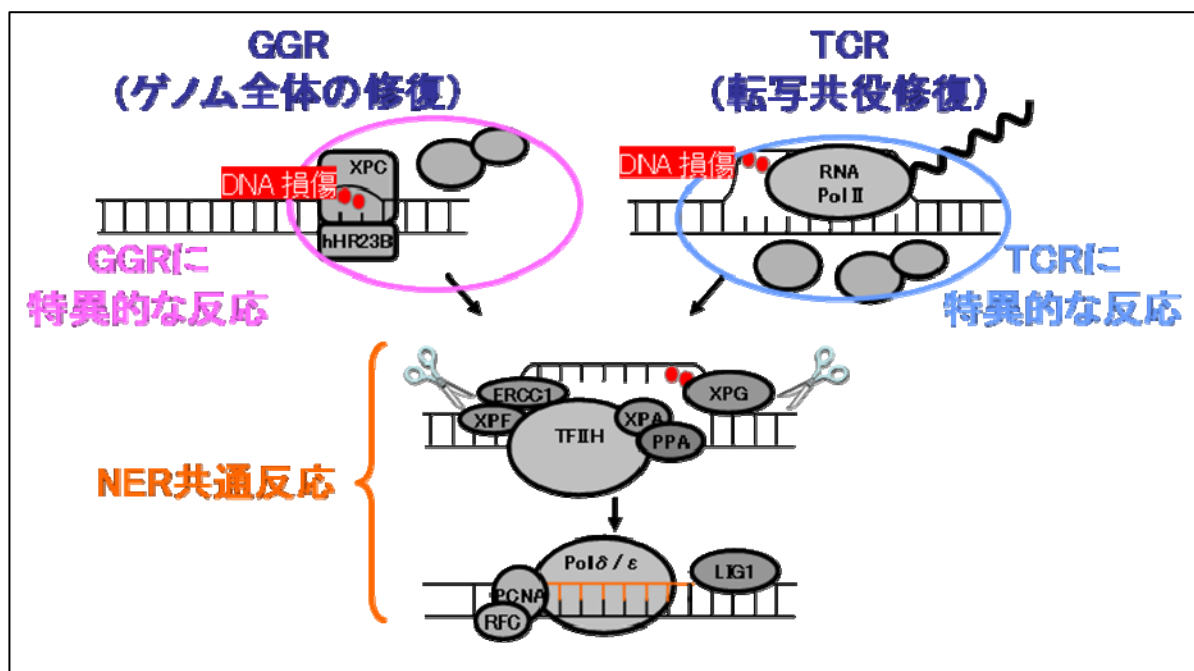


図 4(3)-4 ヌクレオチド除去修復 (NER) の 2 つの反応経路

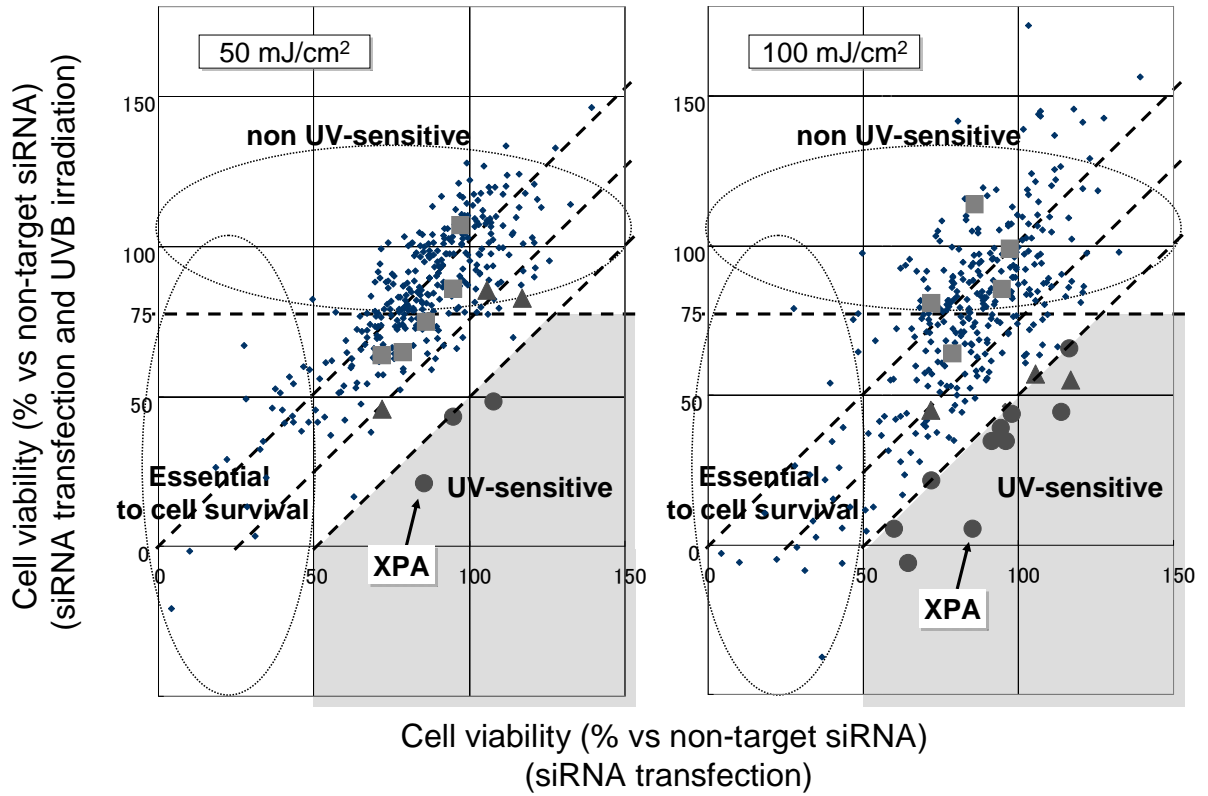


図 4(3)-5 RNA 干渉および紫外線照射後の細胞生存率

- : 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

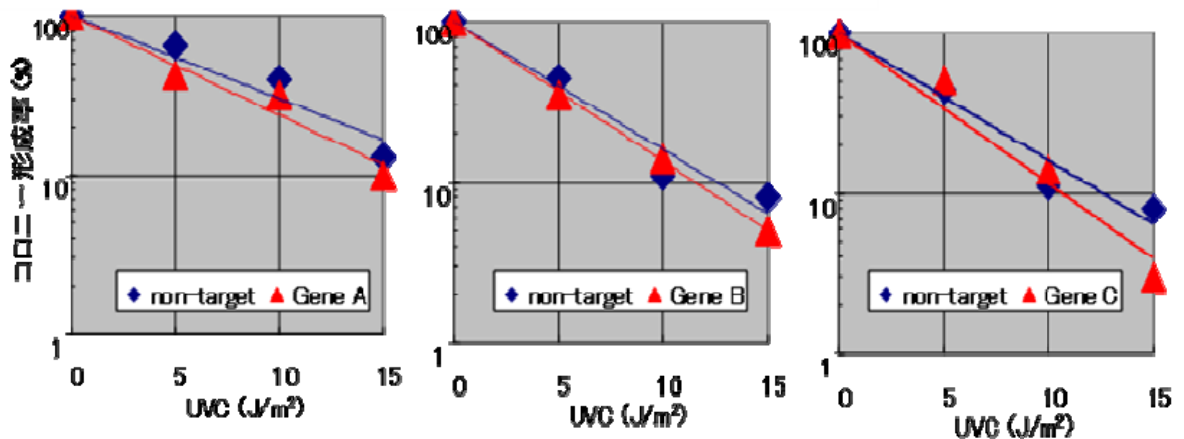


図 4(3)-6 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子の発現抑制による紫外線感受性への影響

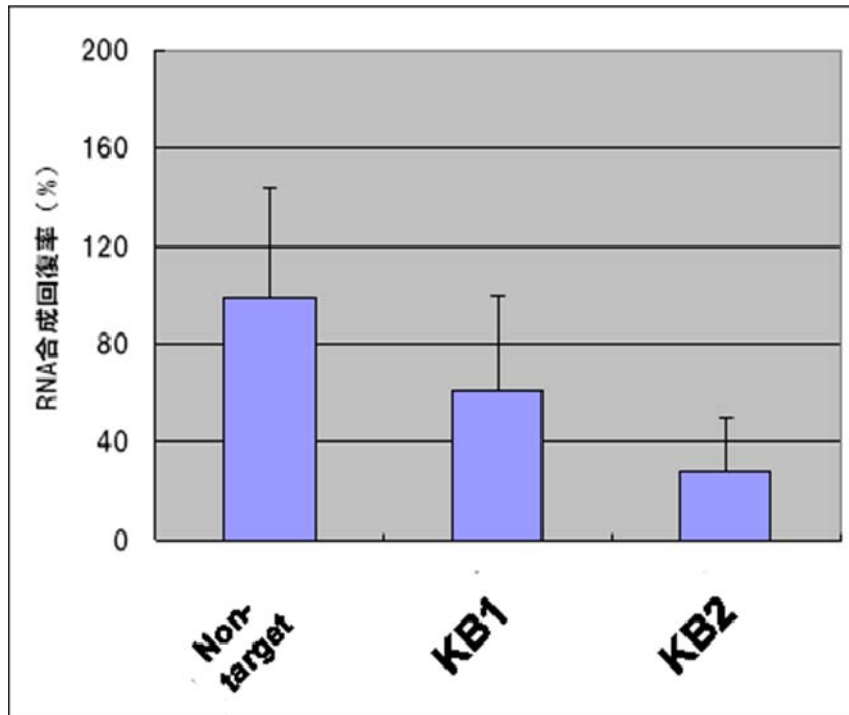


図 4(3)-7 KB 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響

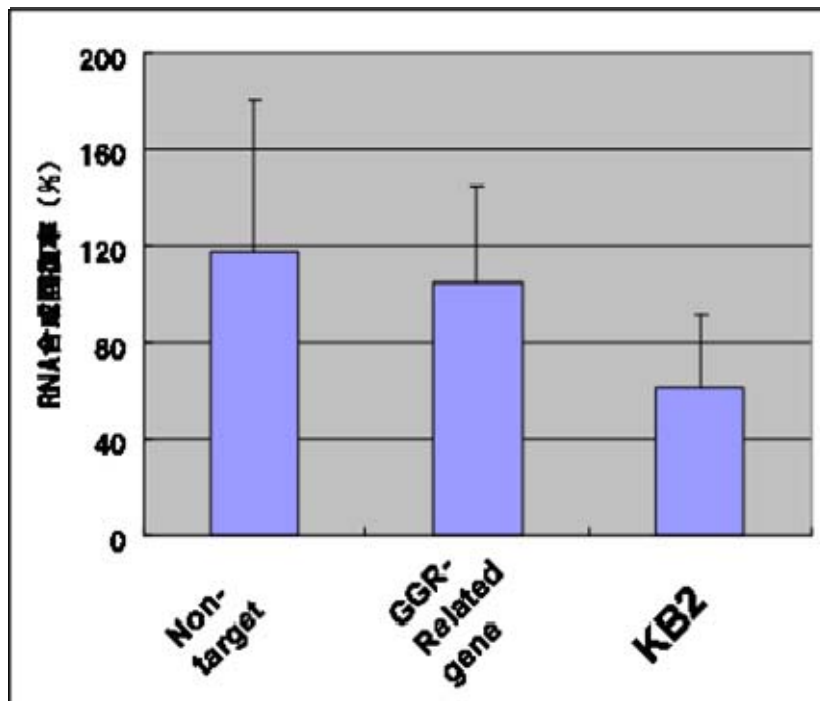


図 4(3)-8 GGR 特異的な反応に関わる遺伝子および KB2 遺伝子の発現抑制による TCR 活性への影響



図 4(3)-9 KB2 のウェスタン解析

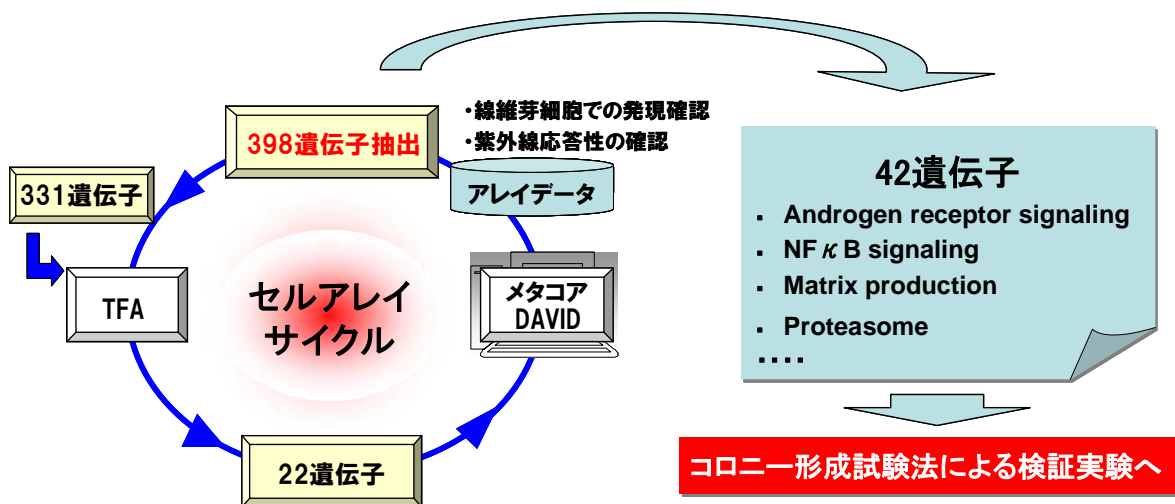


図 4(3)-10 紫外線感受性候補遺伝子の探索システム拡張スキーム

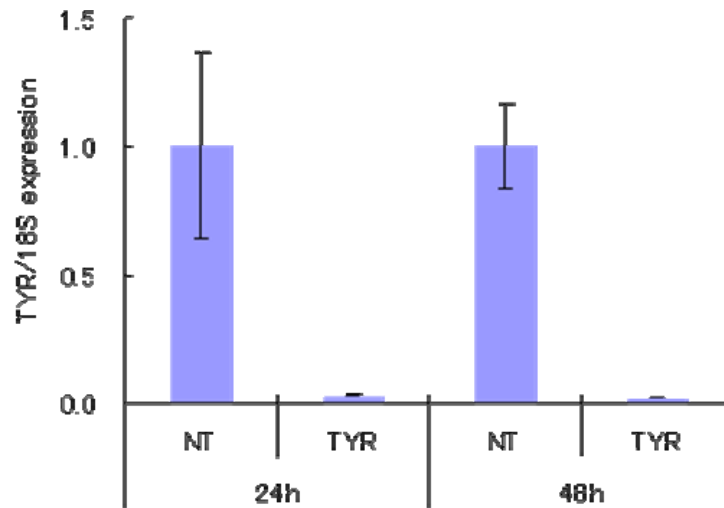


図 4(3)-11 固相リバーストランスフェクション法によるヒト正常メラノサイトの Tyrosinase 遺伝子発現抑制
NT, Non-target siRNA; TYR, Tyrosinase siRNA

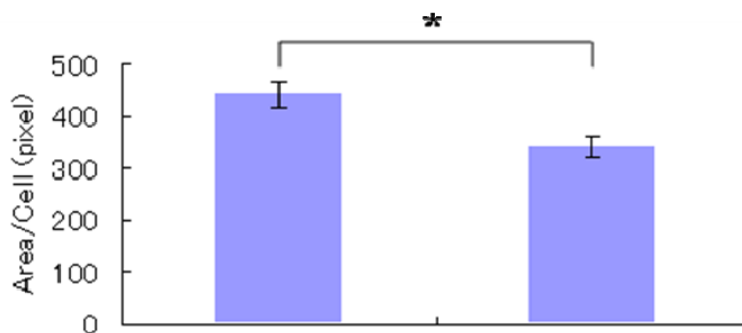
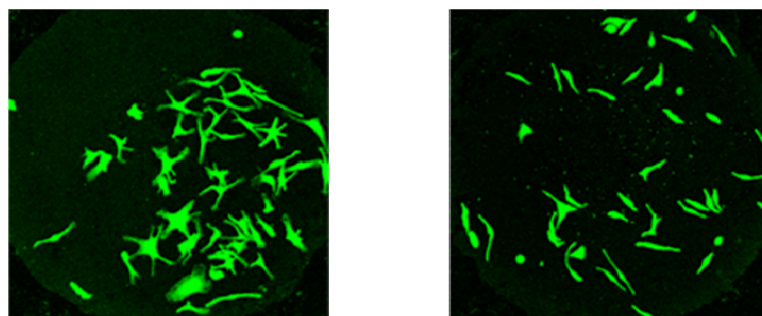
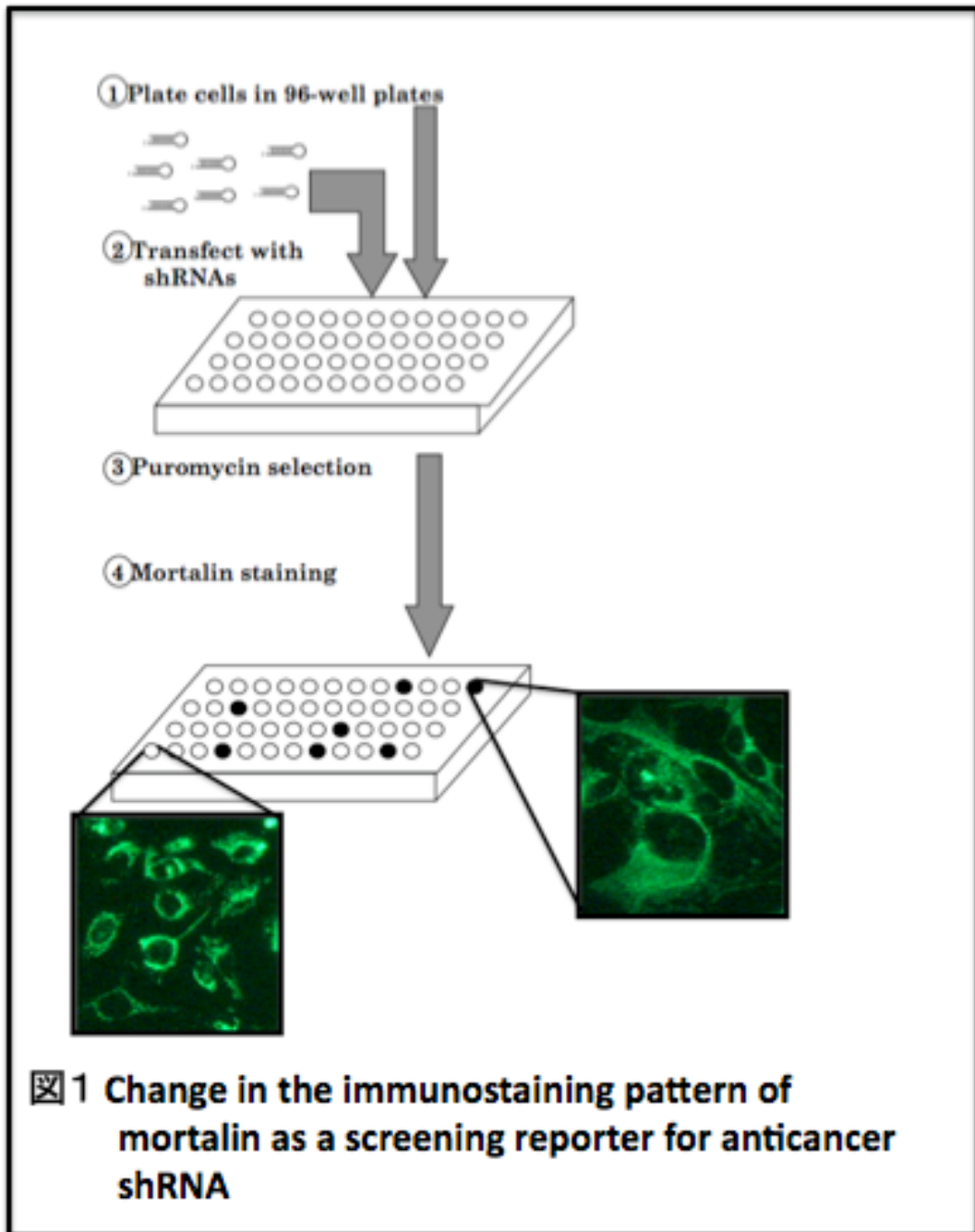
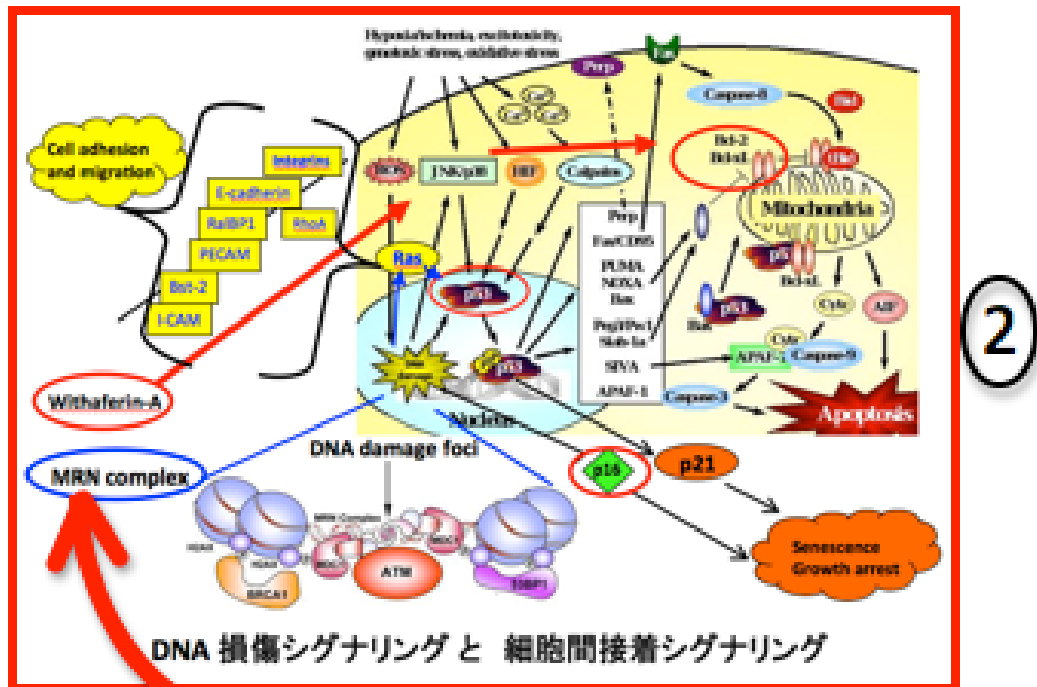


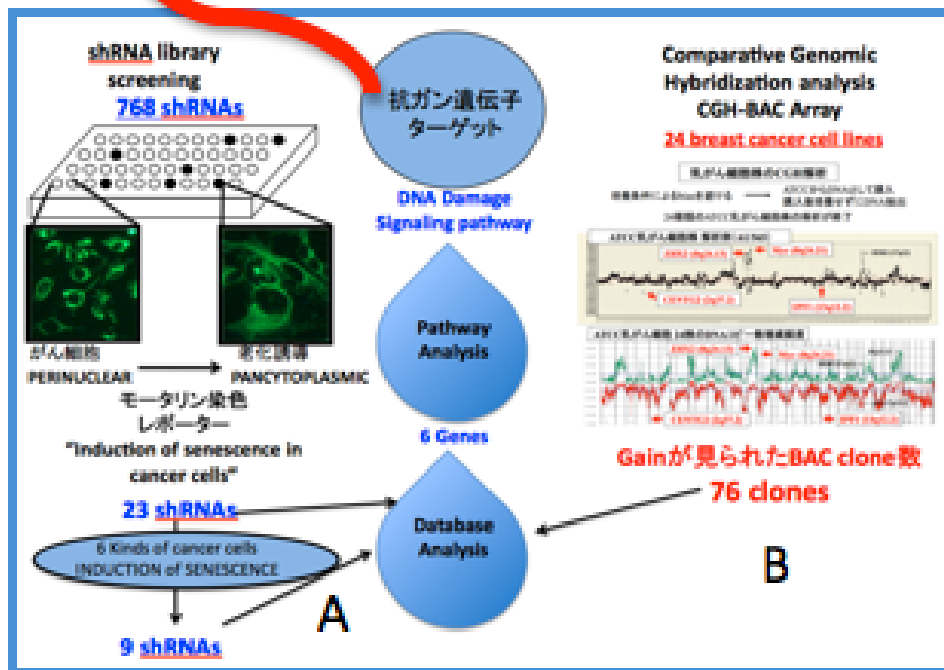
図 4(3)-12 メラノサイトの蛍光標識 (上部画像) と形態変化 (細胞面積) の数値化 (下部グラフ)
左: 増殖用培地で培養したメラノサイト (活性化状態)
右: 最小培地で培養したメラノサイト (不活性化状態)
* t-test ($p < 0.05$)



☒ 4(4)-1



2



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 4(4)-2

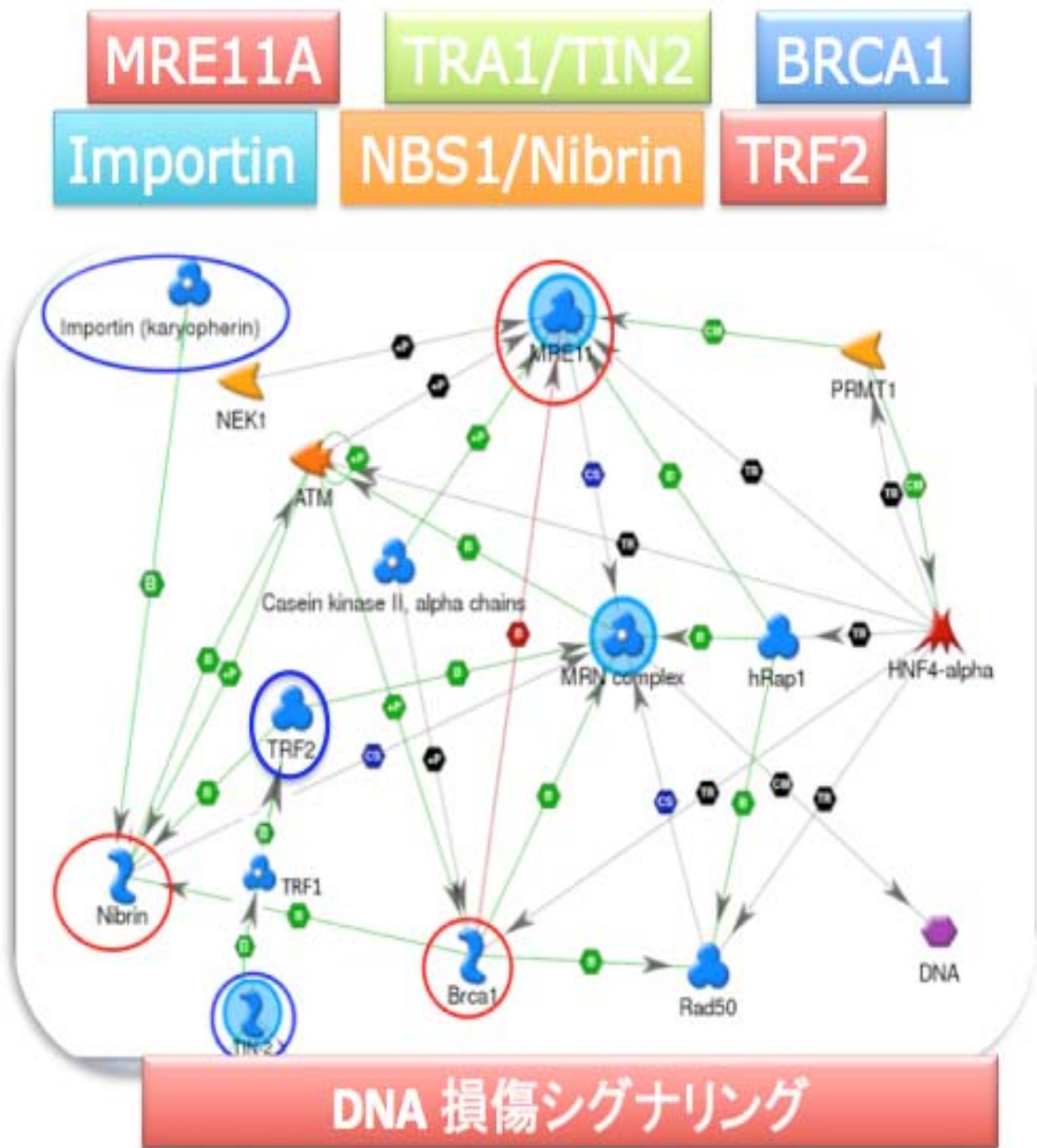
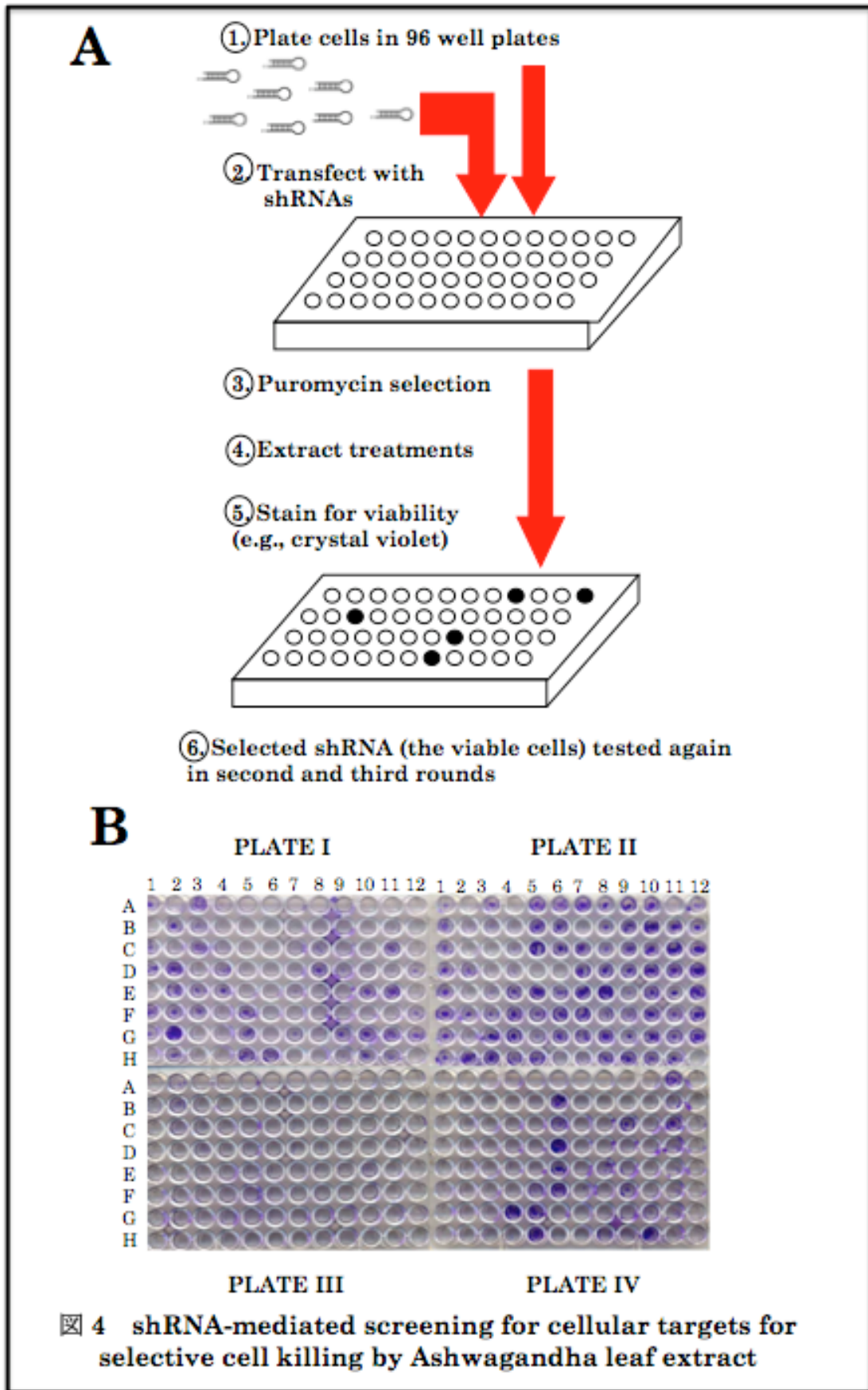
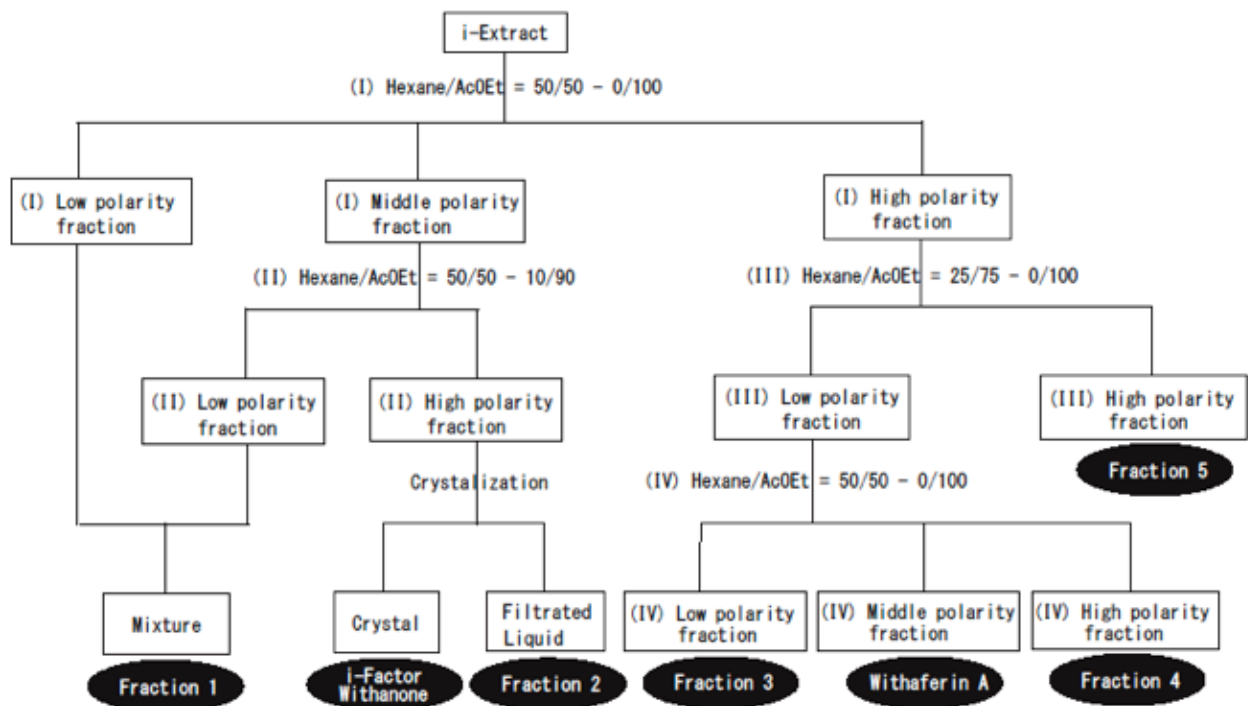


図3 Gene targets selected on the basis of shRNA library screening for induction of senescence in cancer cells

図 4(4)-3

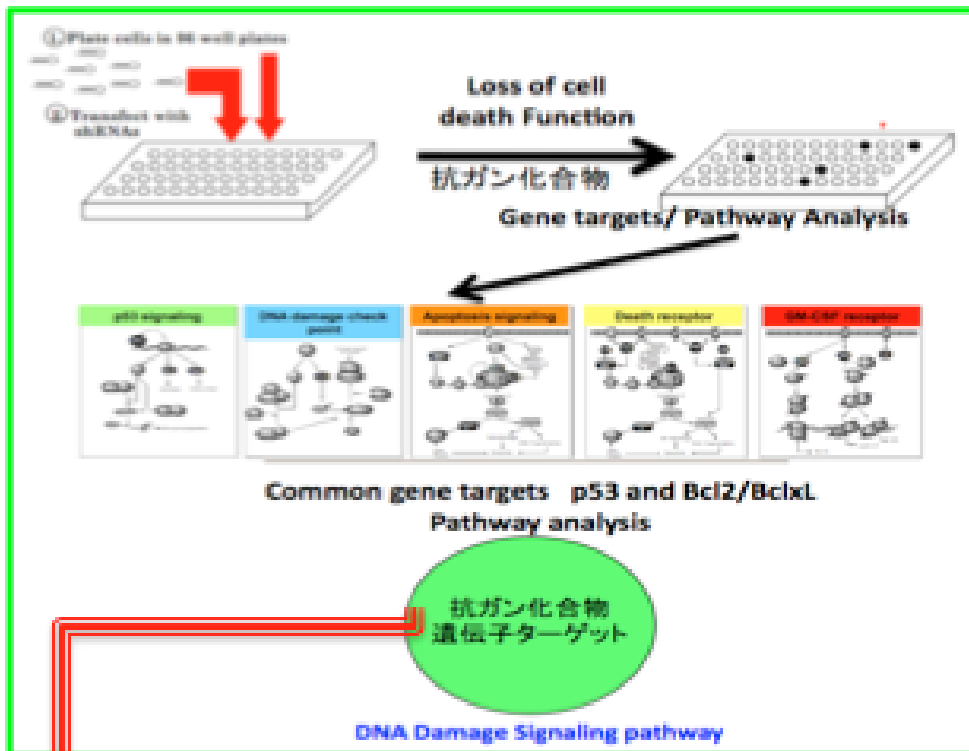


☒ 4(4)-4

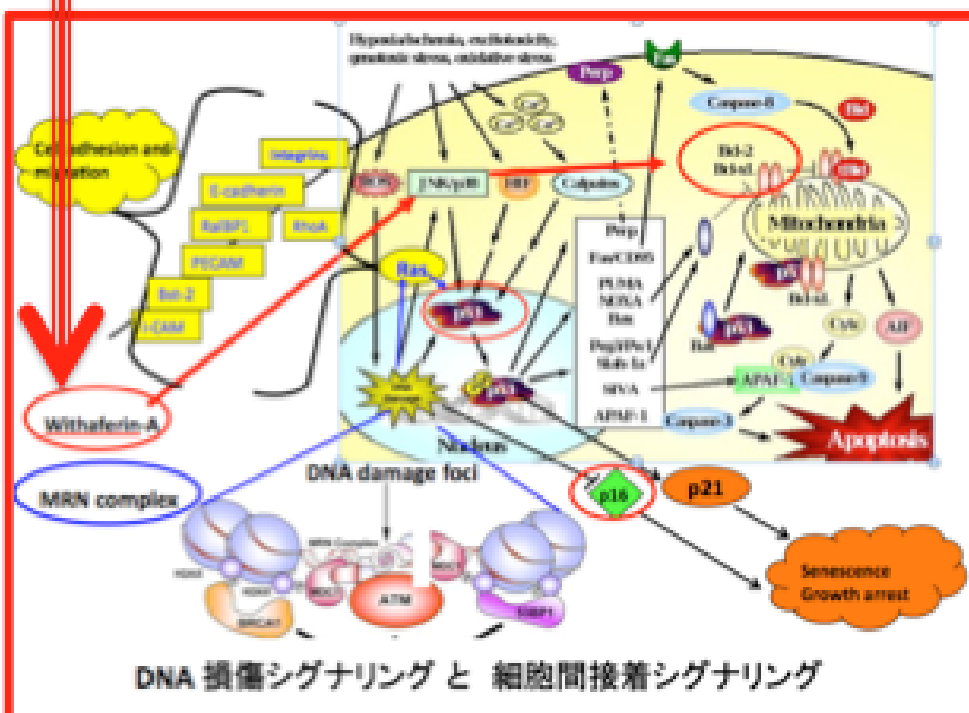


☒5 Fractionation of i-Extract by silica gel chromatography using silica gel column

☒ 4(4)-5



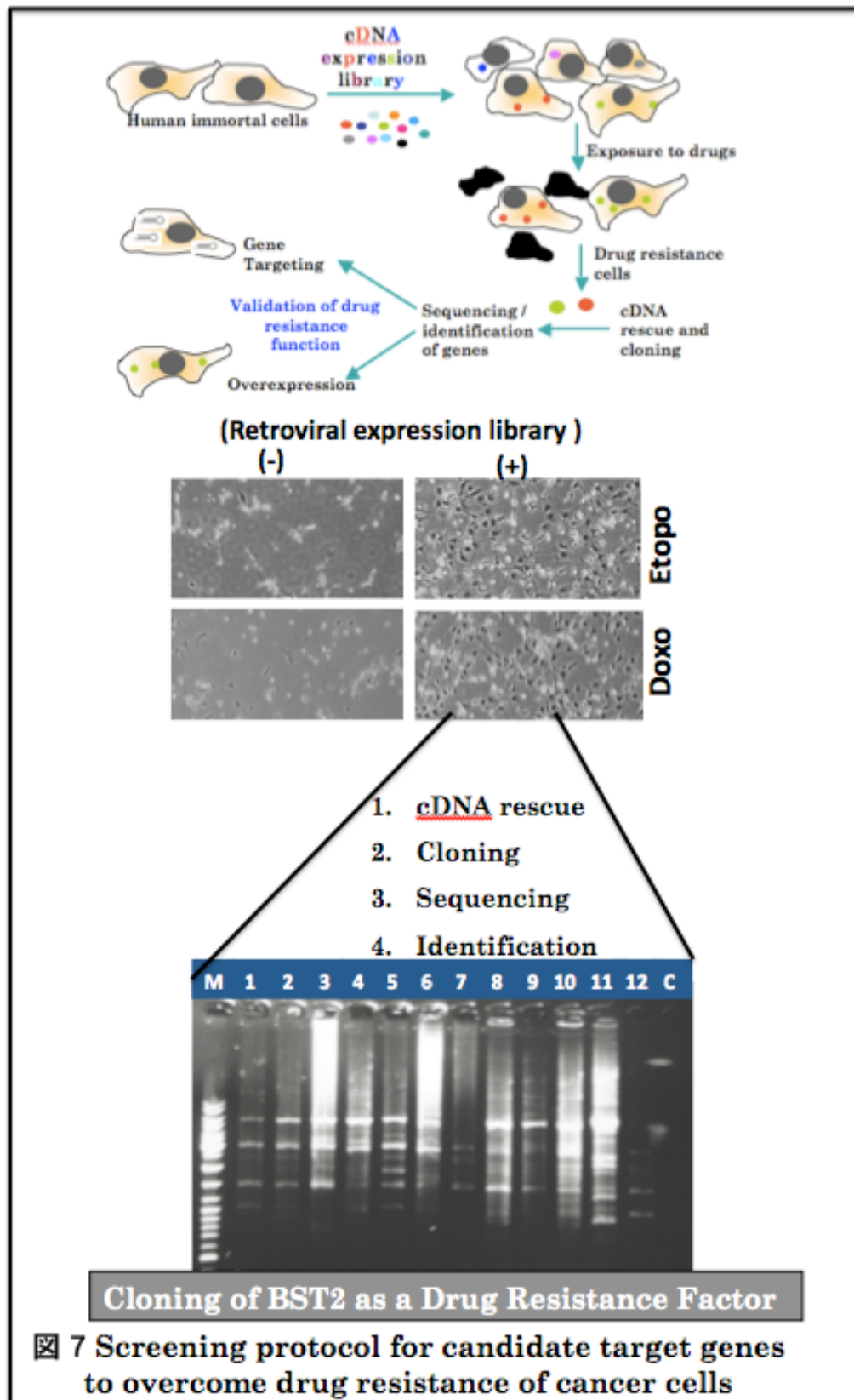
3



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

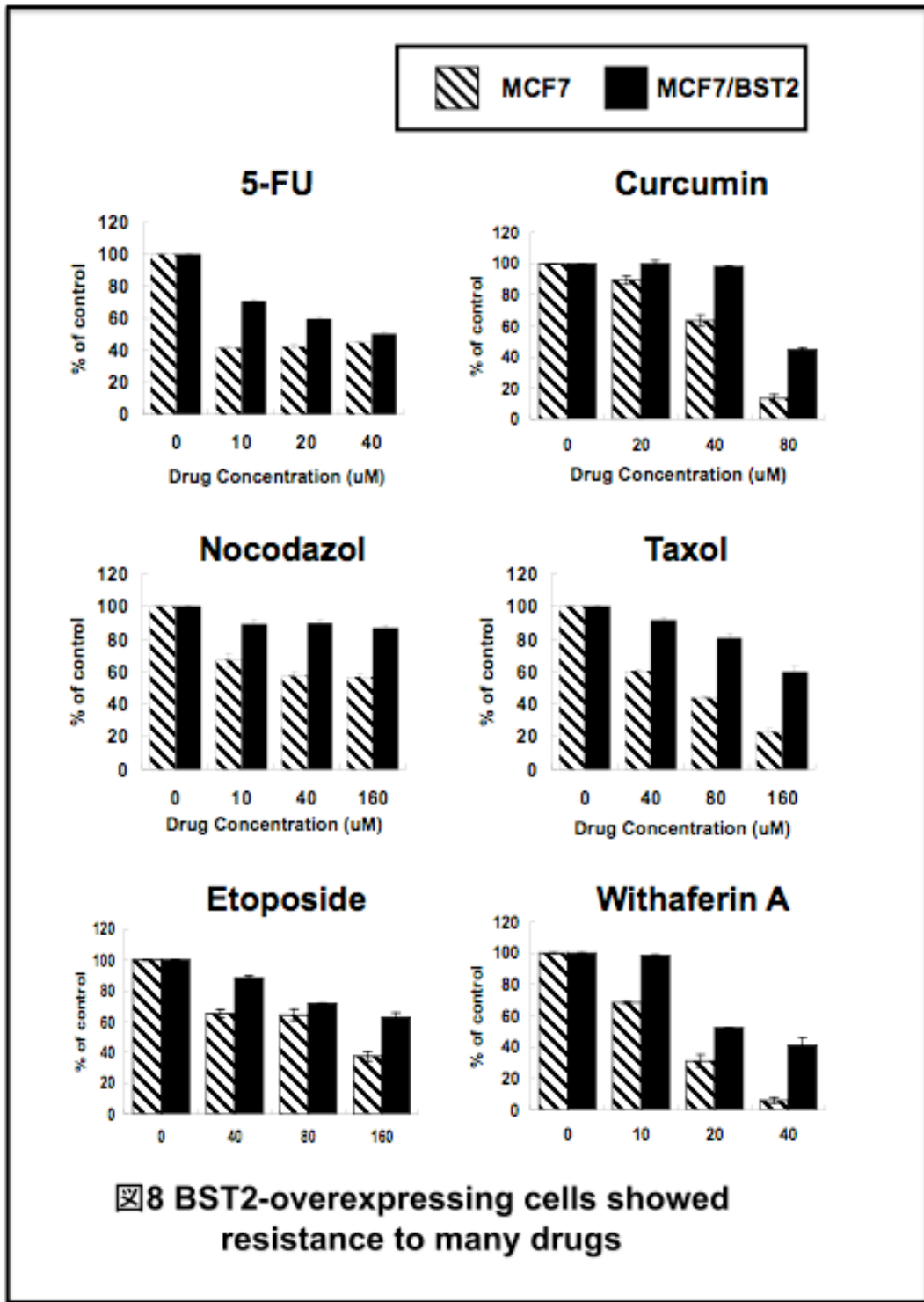


Figure 4(4)-8

圖 4(4)-9

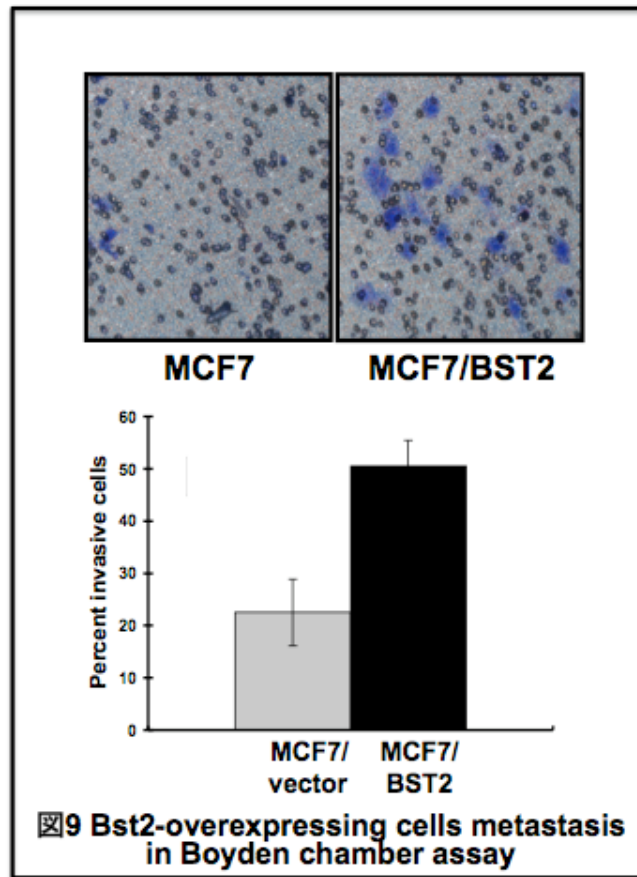
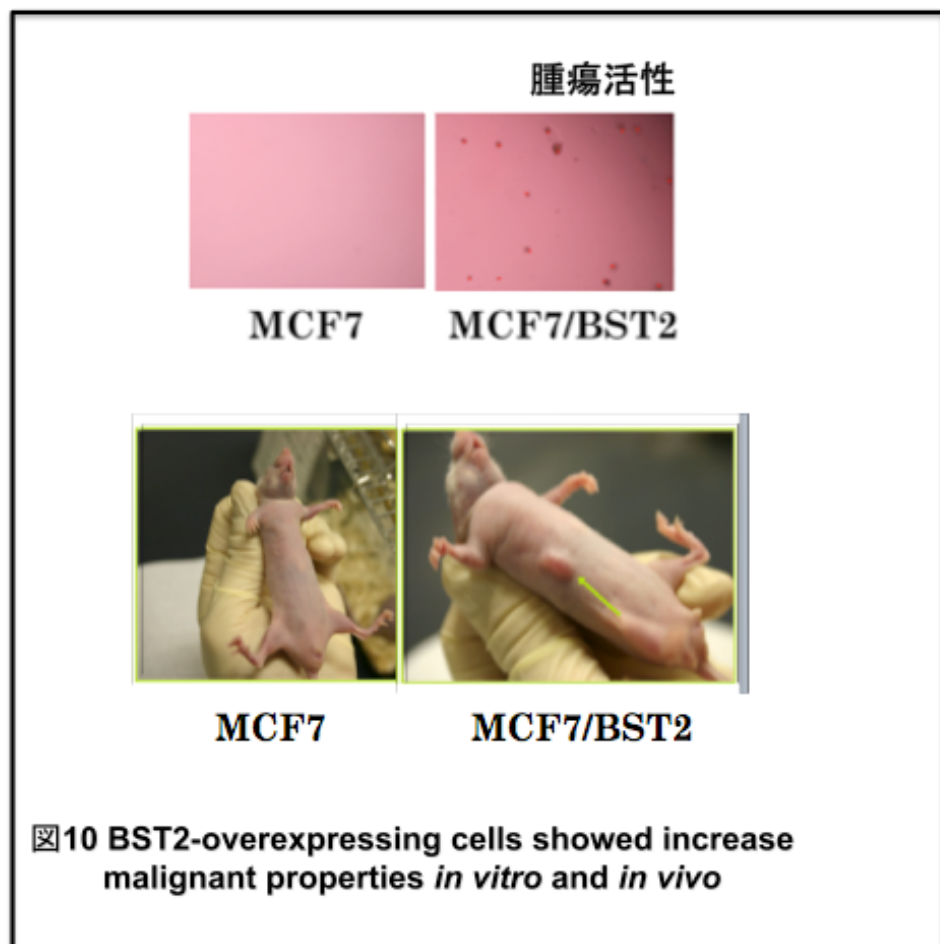
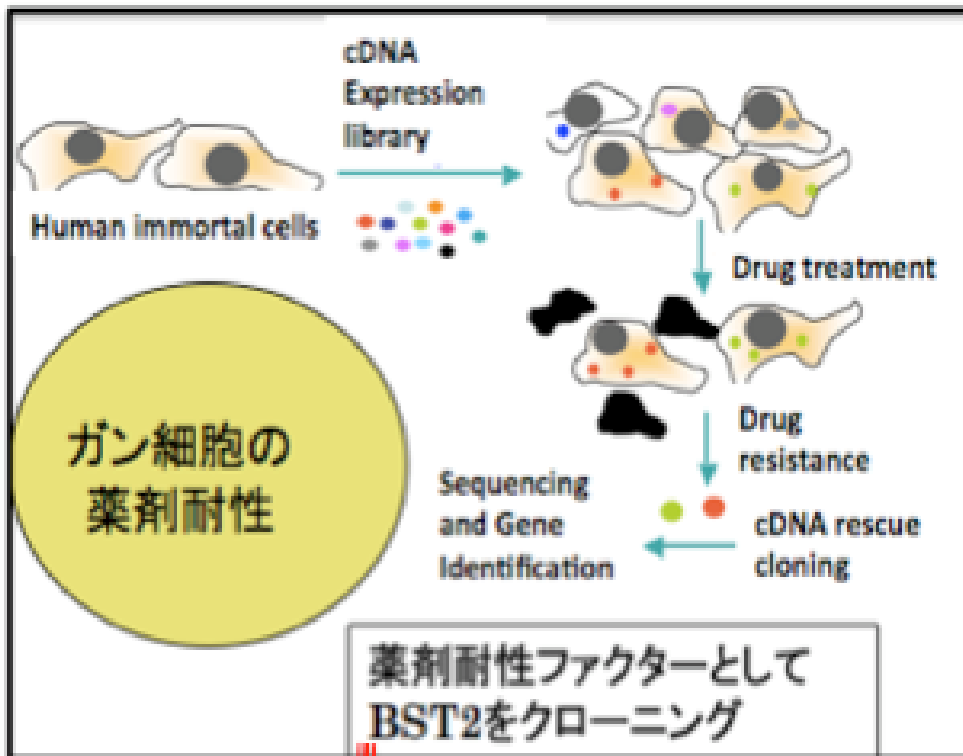
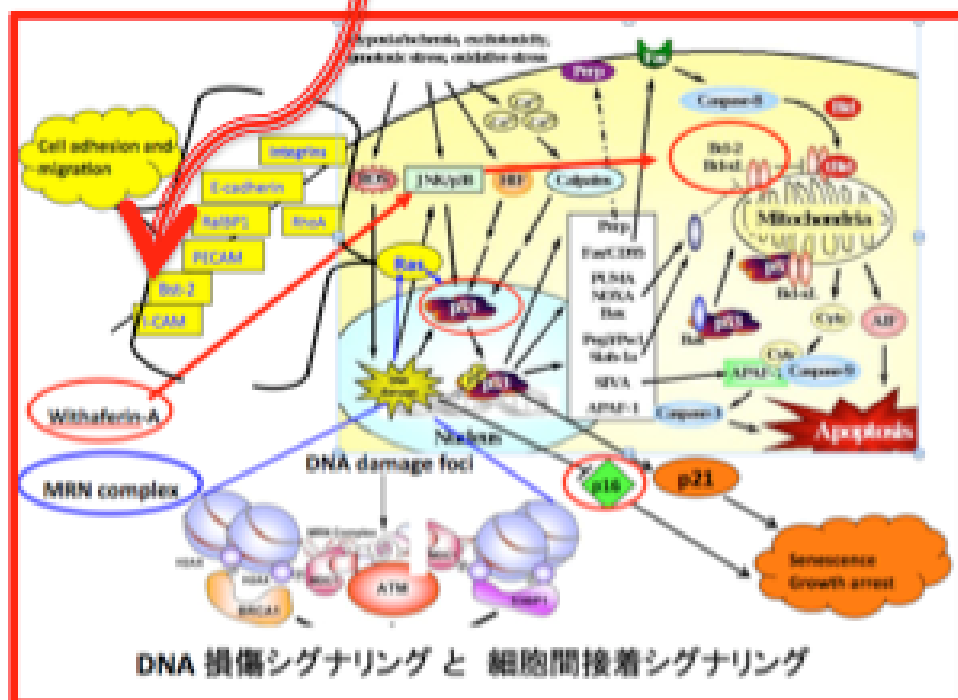


圖 4(4)-10





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。

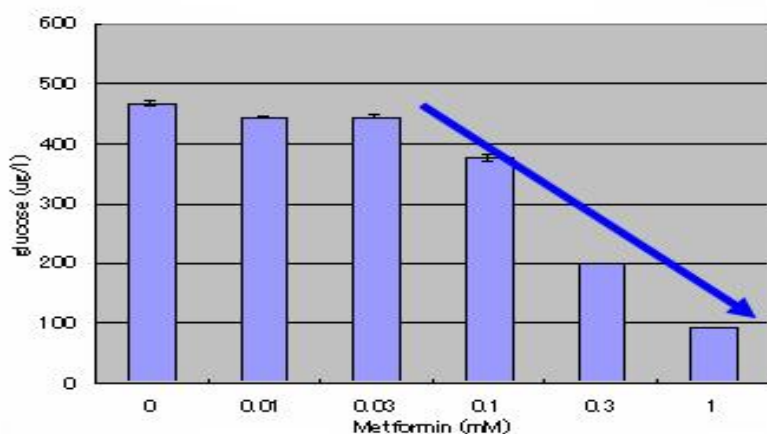


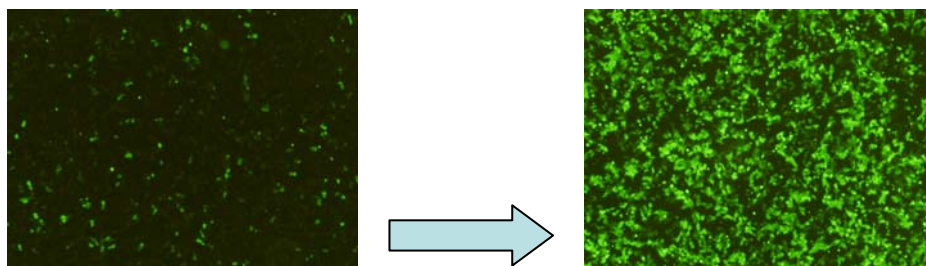
図 1. メトフォルミン刺激による糖産生抑制作用

(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。)

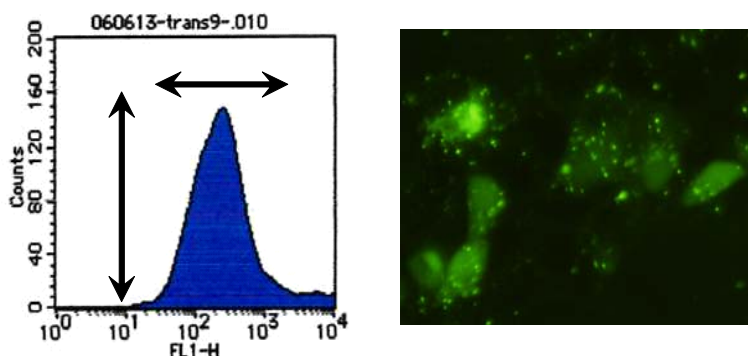


図 3. 蛍光標識オリゴ核酸 (siRNA) の導入技術開発

(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。そのためまず、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。

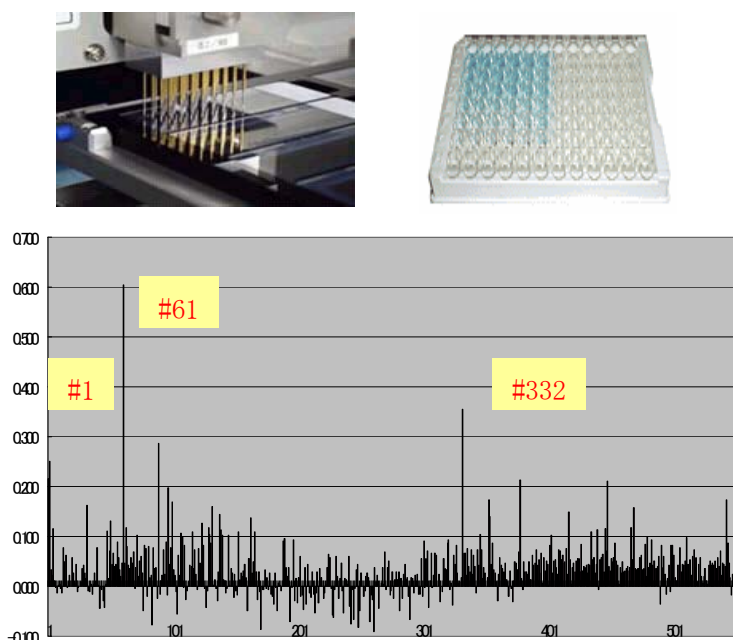


図 4 A. メトフォルミン薬効のリン酸化プロファイリング

(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)

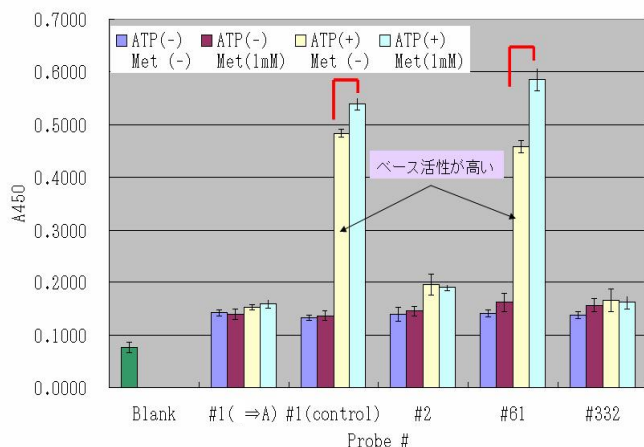


図 4 B. メトフォルミン応答性リン酸化
マーカー探索

(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。)

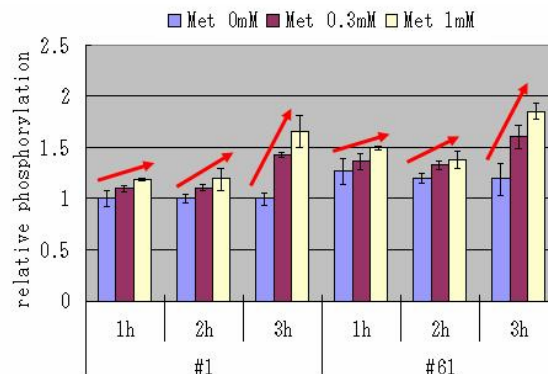


図 4 C. メトフォルミン応答性
リン酸化マーカー

(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。

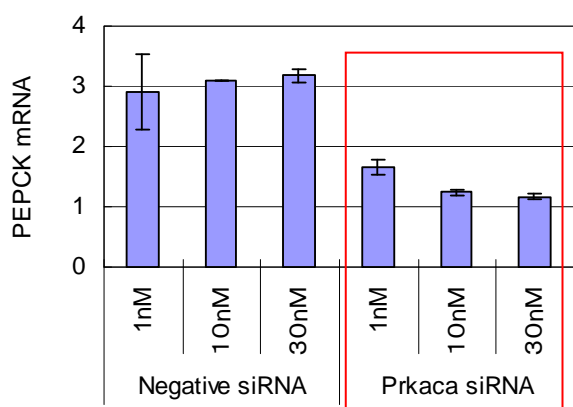


図 5 A. siRNA 導入による PEPCK mRNA レベルの変化

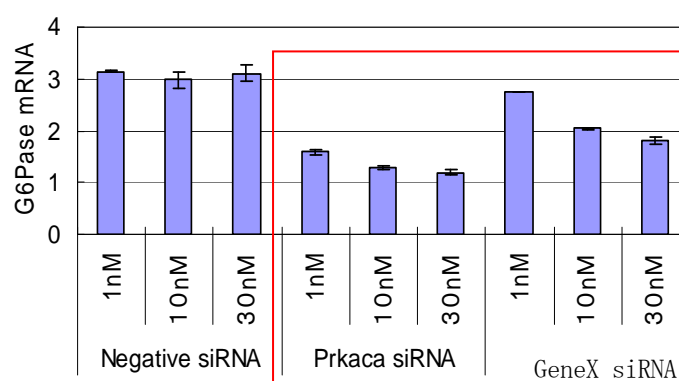


図 5 B. siRNA 導入による G6Pase mRNA レベルの変化

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。

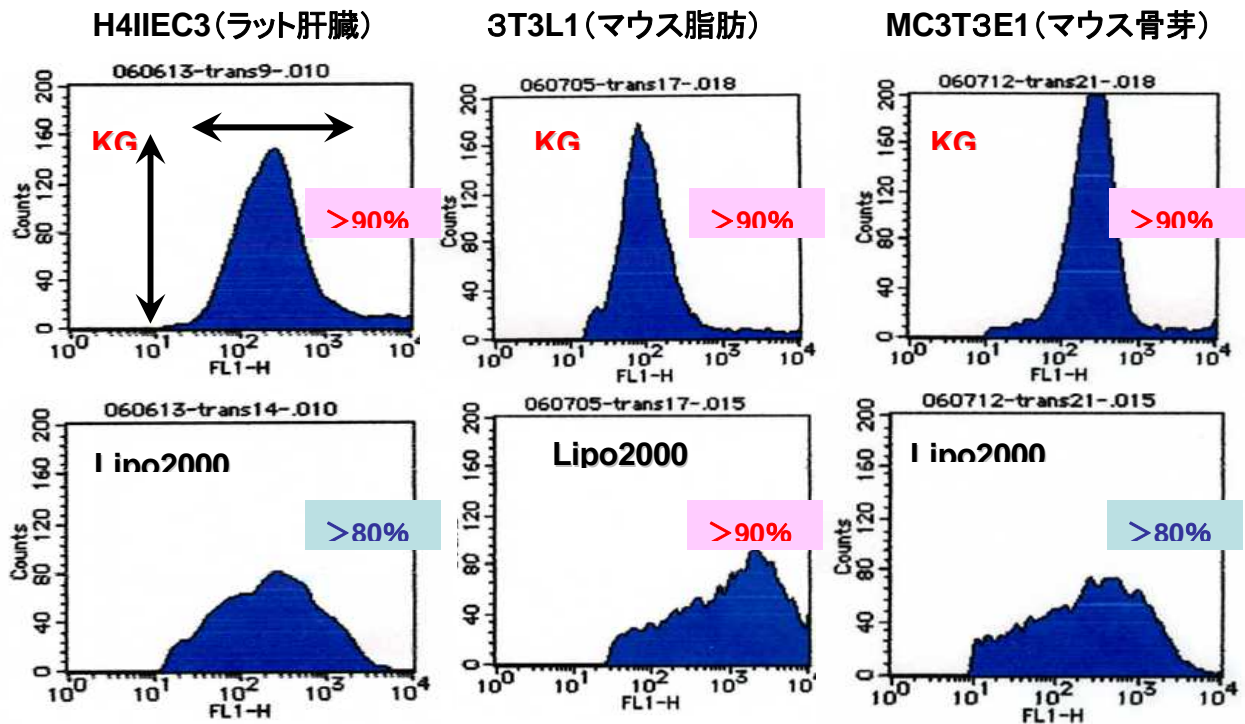


図6. 新規な導入試薬 KG6 を用いた蛍光標識 siRNA 導入技術の一般化

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トを探索可能とした。
- 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

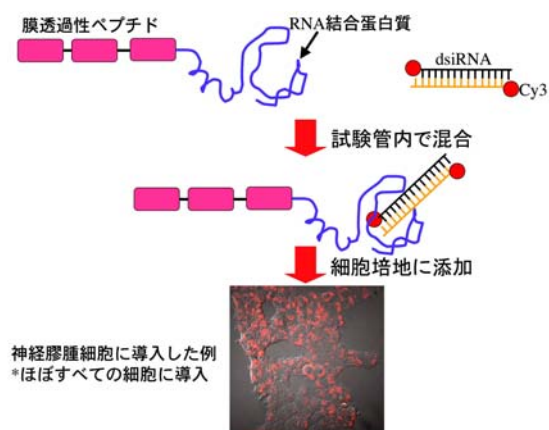


図1 タンパク質導入法を利用したsiRNA導入法の開発

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。

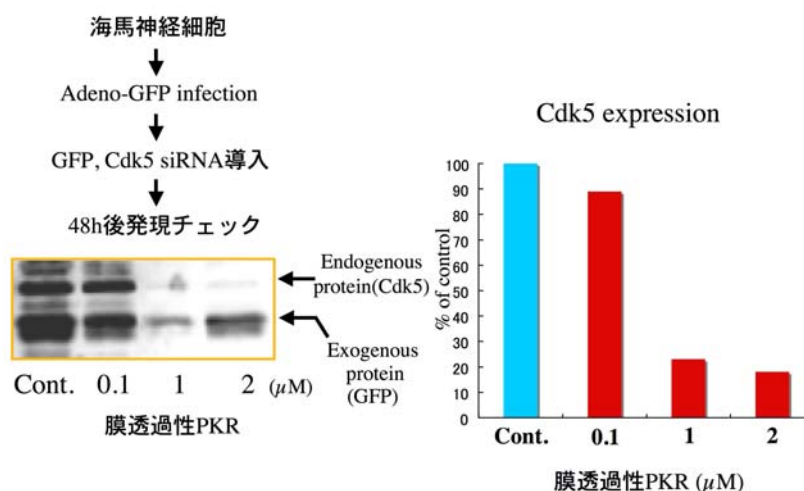


図2 新規siRNA導入法によるノックダウン結果

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)。

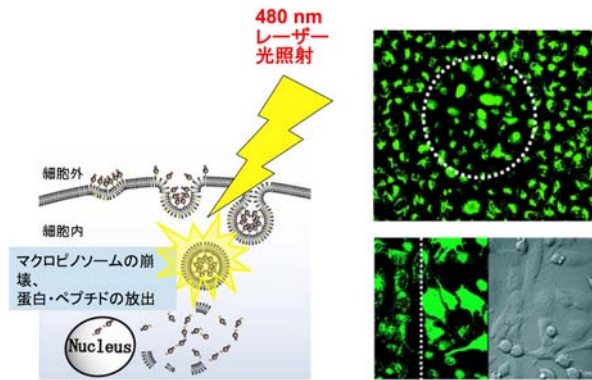


図3 480nm波長レーザー照射による導入蛋白質の
マクロピノソームからのリリースング技術開発

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

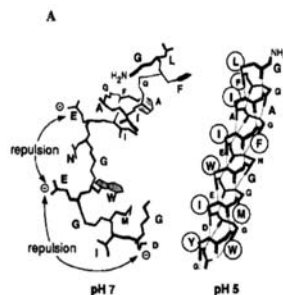
インフルエンザウイルスが発現するヘマグルチニンサブユニットは、この23個からなるペプチドで、pHが7付近では細胞膜に対して影響を及ぼさないが、pHが低下すると、細胞膜を壊す能力を有する。そこで、マクロピノソーム放出ペプチド (GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG) に9個のアルギニンおよび2個のグリシンリンカーを付加した膜透過型マクロピノソーム放出ペプチド (RRRRRRRRRGGLFEAIEGFIENGW-EGMIDGWYG) を合成した。1 μ M 膜透過型 PNA (FITC 付加) および2 μ M 膜透過型マクロピノソーム放出ペプチドを293細胞培養培地に添加し、リアルタイ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)

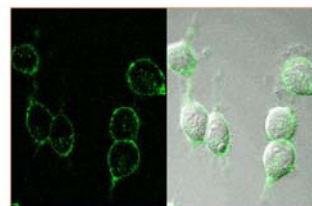
:

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

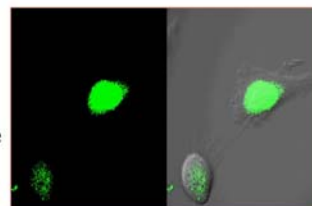


図4 HA2ペプチドを用いたマクロピノソーム
リリースング技術開発

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。

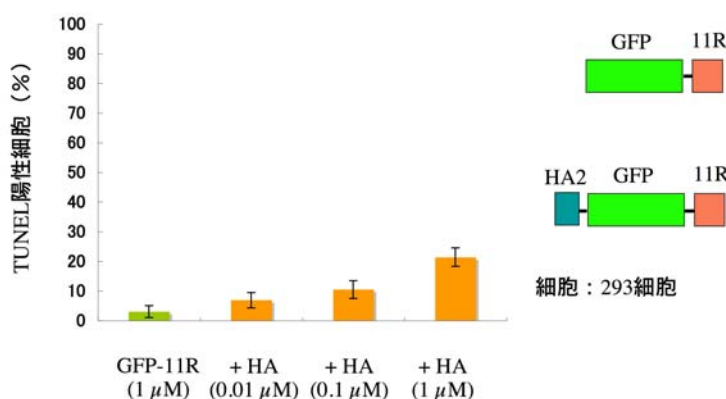


図5 HA2ペプチドによるマクロピノソームリリーシング法の問題点

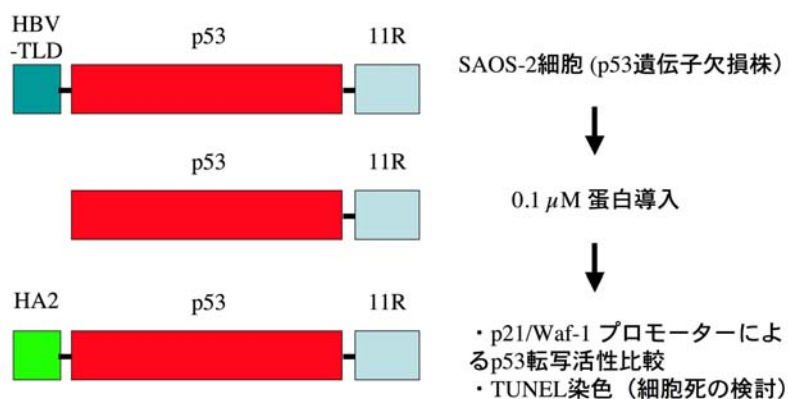


図6 肝炎ウイルスの translocation domain を利用したマクロピノソームリリーシング法の開発

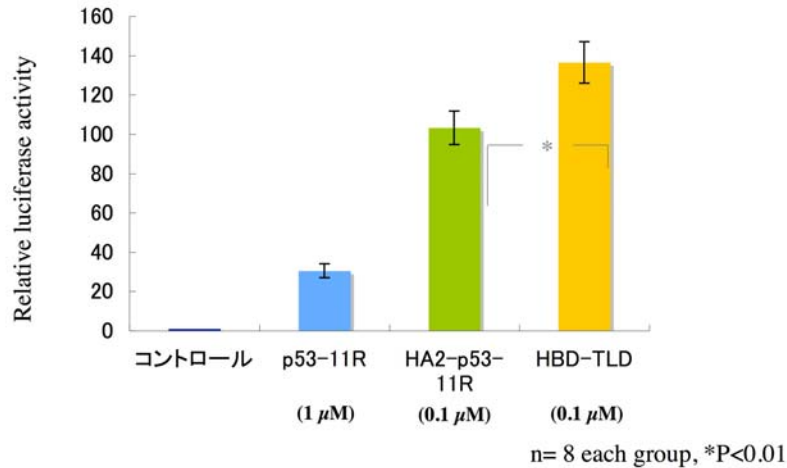


図7 肝炎ウイルスの translocation domain (HBD) は、HA2よりマクロピノソームリリーシング効果大きい

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。

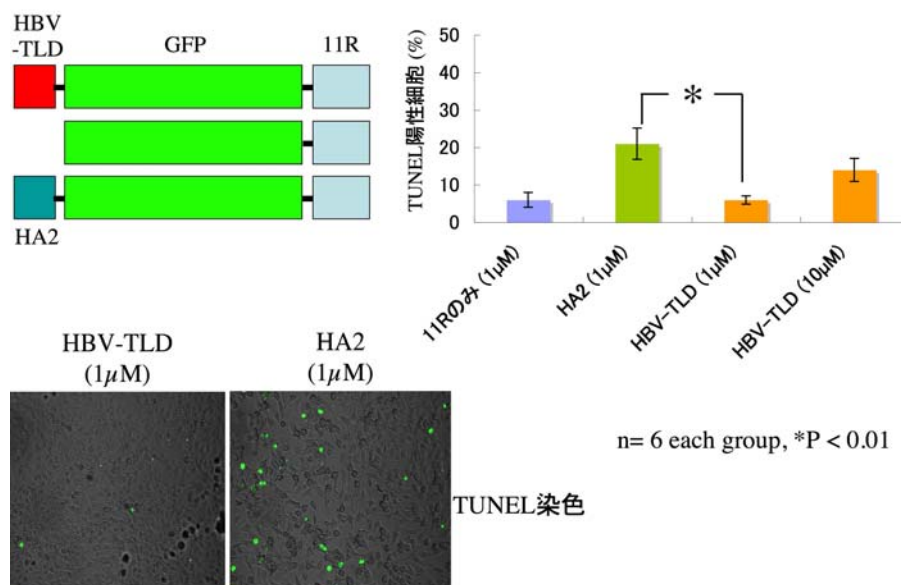


図8 細胞毒性試験

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)。

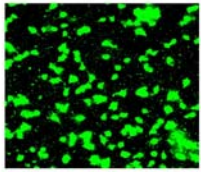
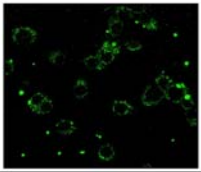

	導入効率	GFP蛋白 イメージング像
50%以上の細胞 に導入が認めら れた細胞種数	74/86 (86%)	
細胞内に導入は 認められたが、小 器官内への蓄積 が認められた細 胞種数	6/86 (7%)	
細胞内への導入 が50%未満で あった細胞種数	6/86 (7%)	

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。

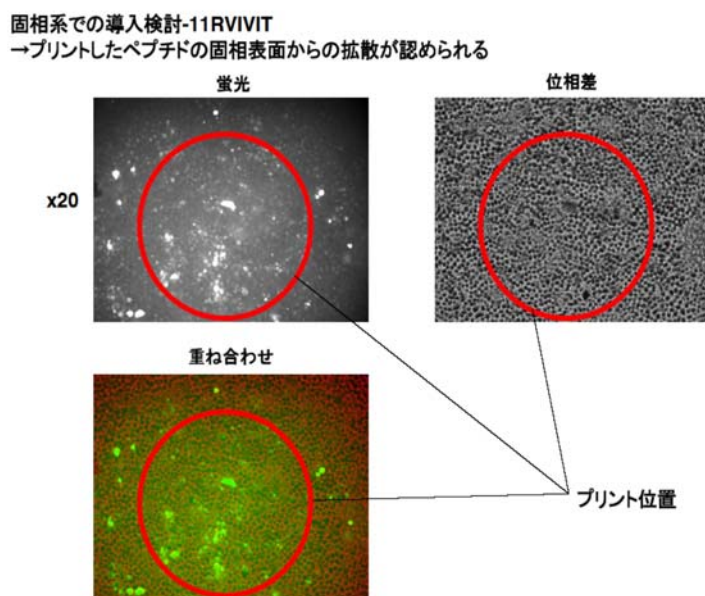


図10 ペプチドが固相表面から拡散している

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。

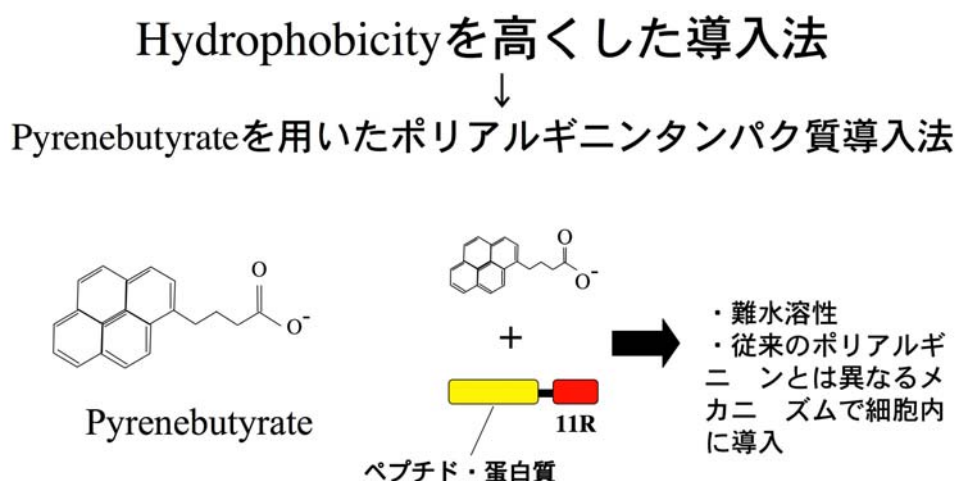


図11 ポリアルギニンを利用した新しいペプチド・タンパク質導入法の開発

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。

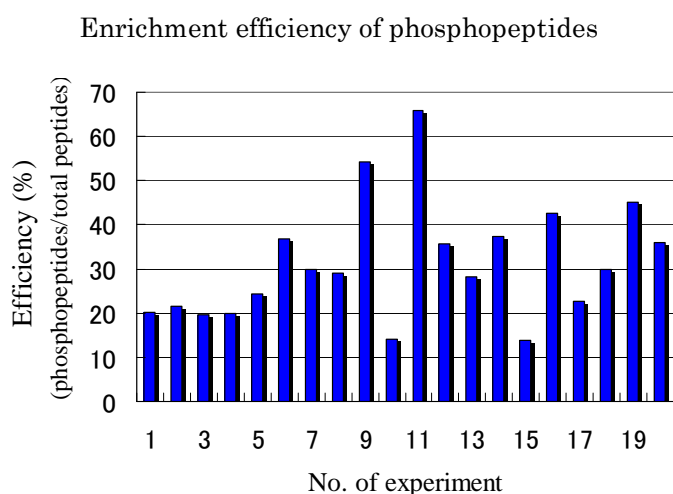


図 12 リン酸化ペプチドの精製効率 (n=20)

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フォ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

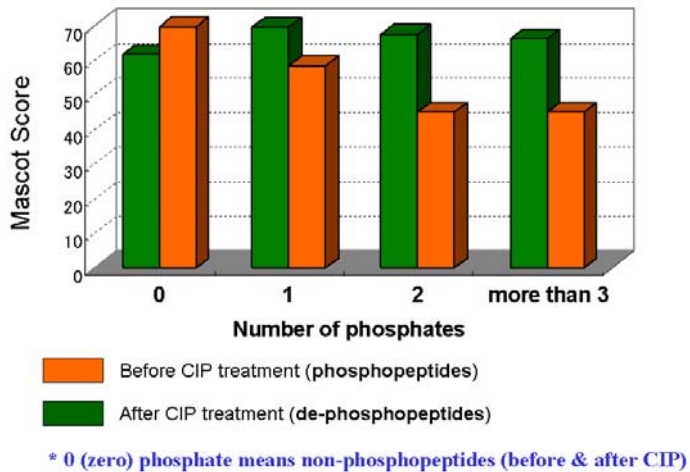
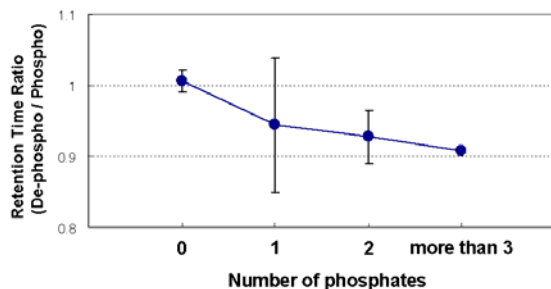


図 13 リン酸基の有無による検索スコア値の変化

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.

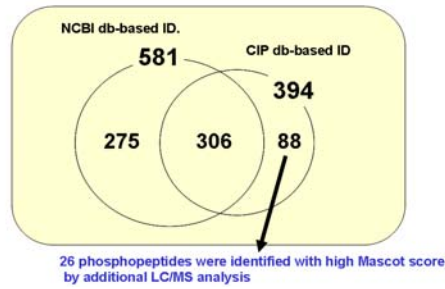


図 15 リン酸基を外してから同定を行い、それをデータベースとして利用

Distribution of phosphates number in a tryptic phosphopeptide

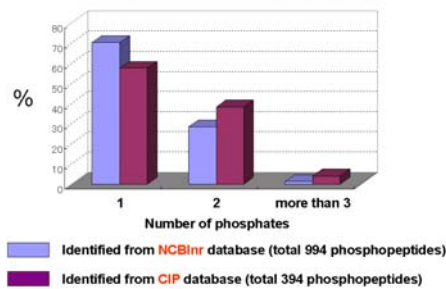


図 16 リン酸基除去データベース同定による 1 ペプチド当りのリン酸基数

Distribution of phospho-amino acids

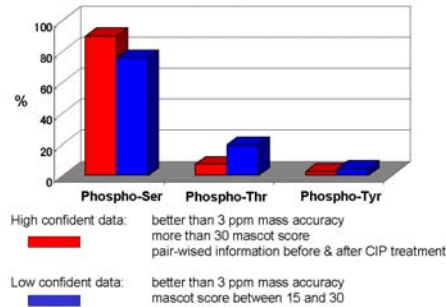


図 17 リン酸化されたアミノ酸の割合について

これまでに我々は、マウス脳から 2907 ヌ所、Neuro2a 細胞から 1708 ヌ所、BAFc 細胞から 693 ヌ所、HCT116 細胞から 321 ヌ所、PC9 細胞から 370 ヌ所、HepG2 細胞から 210 ヌ所、DU145 細胞からは 224 ヌ所、MCF7 細胞からは 186 ヌ所、マウスのリンパ球から 354 ヌ所、マウス精巣から 135 ヌ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。

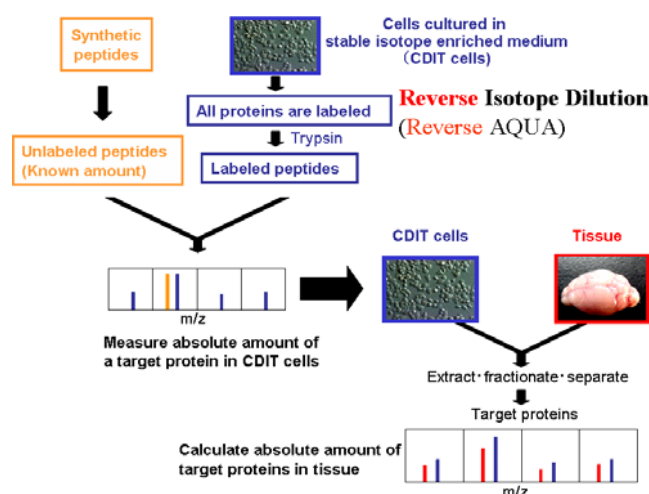


図 18 網羅的安定同位体元素標識法による絶対定量について

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。

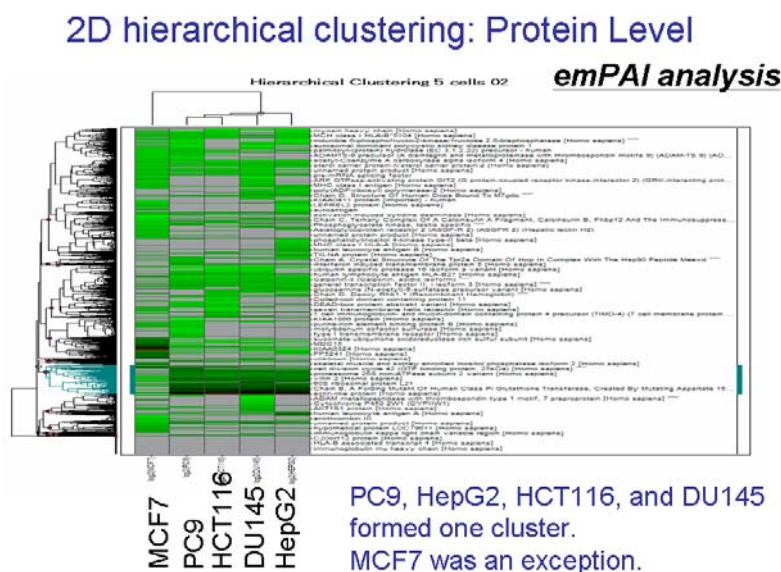


図 19 簡易定量 emPAI による各種癌細胞の発現プロファイル

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くない。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)。

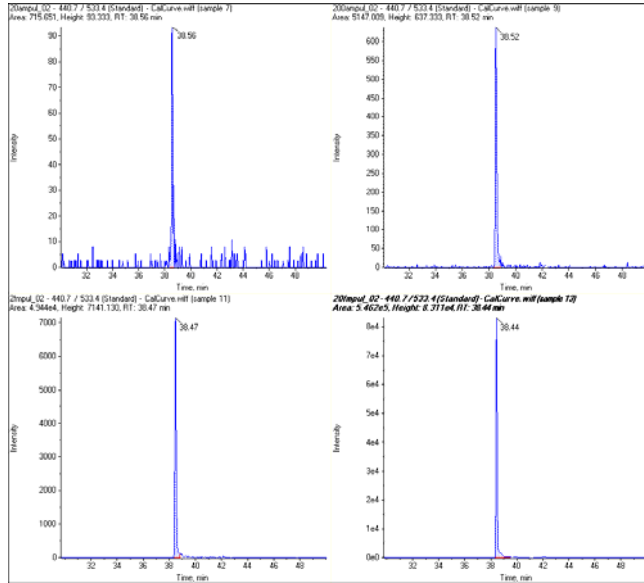


図 20 MRM 法による典型的なマスクロマトグラム

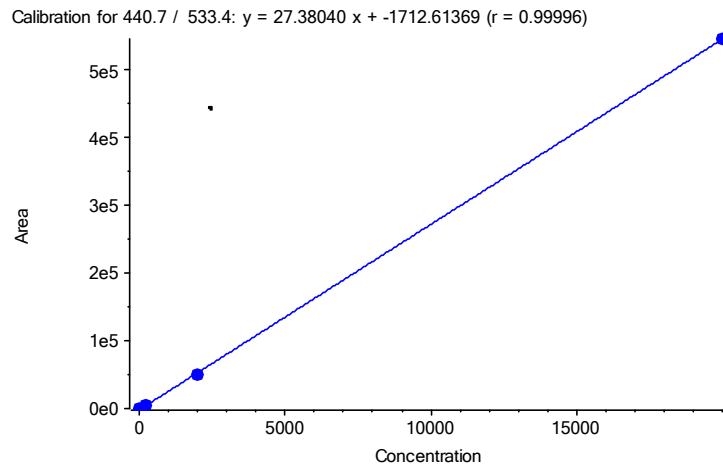


図 21 MRM 法での直線性～オミクス解析に用いる装置より 100 倍程度ダイナミックレンジが広い

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超微蛍光レポーター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。

- I. 産総研・JBA グループ (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)
- II. アステラス製薬
- III. エーザイ、岡山大学

I. 産総研・JBA グループ

1. 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 (臨海)

論文

1. Hakamada, K.1, Fujita, S.1, Miyake, J. (2009) In silico synchronization: a novel method for synchronization of mammalian cells without any exogenous stressors. *J. Biosci. Bioeng.*, In press. 1Equal contribution (IF: 1.702)
2. Iwamoto M., Taki, T., Fujita, S. (2009) Selection of the biotin protein ligase by phage display using a combination of in vitro selection with in vivo enzyme activity. *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 230-234. (IF: 1.702)
3. Yamada, S., Hakamada, K., Munakata, T., Takano, K., Fujita, S.*, Miyake, M*, Miyake, J. (2009) The system for analyzing the event timing profile of each single-cell by using the model of neurite maturation of PC12D cells. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1493-1497. *Corresponding Author (IF: 5.143)
4. Onuki-Nagasaki, R.1, Nagasaki, A.1, Hakamada, K., Uyeda, Q., P., T., Fujita, S.*, Miyake, M., Miyake, J. (2008) On-chip screening method for cell-migration genes based on a transfection microarray. *Lab Chip*, 8, 1502-1506. 1Equal contribution, *Corresponding Author (IF: 6.478)
5. Yamada, S., Nomura, T., Takano, K., Fujita, S., Miyake, M*, Miyake, J. (2008) Expression of a chimeric CSF1R-LTK mediates ligand-dependent neurite outgrowth. *Neuroreport.*, 19, 1733-1738. *Corresponding Author (IF: 1.904)
6. Yamada, S., Uchimura, E., Ueda, T., Nomura, T., Fujita, S., Matsumoto, K., Funeriu, D. P., Miyake, M*, Miyake, J. (2007) Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 926-930. *Corresponding Author (IF: 2.648)
7. Fujita, S., Ota, E., Sasaki, C., Takano, K., Miyake, M.*, Miyake, J. (2007) Highly efficient reverse transfection with siRNA in multiple wells of microtiter plates. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 329-333. *Corresponding Author (IF: 1.702)
8. Uchimura, E., Yamada, S., Nomura, T., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. (2007) Reverse transfection using antibodies against cell surface antigen in mammalian adherent cell lines. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 152-155. *Corresponding Author (IF: 1.702)
9. Yamada, S., Nomura, T., Uebersax, L., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. (2007) Retinoic acid induces functional c-Ret tyrosine kinase in human neuroblastoma. *Neuroreport*, 18, 359-363. *Corresponding Author (IF: 1.904)
10. Uchimura, E., Yamada, S., Uebersax, L., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. (2007) A Method for Reverse Transfection Using Gold Colloid as a Nano-Scaffold. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 101-103. *Corresponding Author (IF: 1.702)
11. Yamada, S., Uchimura, E., Ueda, T., Iguchi, F., Akiyama, Y., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. (2006) Area based Analyzing Technique at Cell Array Experiment using Neuronal Cell Line. *NanoBiotech.*, 2, 95-100. *Corresponding Author (IF: -)

12. Ago, H., Uchimura, E., Saito, T., Ohshima, S., Ishigami, N., Tsuji, M., Yumura, M., Miyake, M. (2006) Mechanical immobilization of HeLa cells on aligned carbon nanotube array. *Materials Lett.* 60, 3851-3854.
13. Onuki-Nagasaki, R., Nagasaki, A., Hakamada, K., Uyeda, Q., P., T., Fujita, S.*, Miyake, M., Miyake, J. (2009) On-chip screening method for cell-migration genes based on a transfection microarray. *Method in Mol Biol*, Submitted, *Corresponding Author
14. Fujita, S., Takano, K., Ota, E., Yoshikawa, T., Sasaki, C., Sano, T., Miyake, M.*, Miyake, J. (2009) High throughput screening with siRNA; RNA Interference: From Biology to Clinical Application. *Method in Mol Biol.*, Min, W-P. eds. Humana Press, In press. *Corresponding Author
15. 長崎晃、長崎玲子、藤田聡史、上田太郎 (2009) 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*、81 (5), 381-386 (IF:0.035)
16. Uchimura, E., Yamada, S., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. (2009) Reverse Transfection Using Gold Nanoparticles; Micro and nano technologies in bioanalysis; *Methods and protocols. Method in Mol Biol.*, Lee, J. W. and Foote, R. S. eds. Humana Press, 544, 609-616 *Corresponding Author
17. Miyake, M., Yoshikawa, T., Fujita, S. (2009) Transfection microarray for drug discovery, *Molecular Systems Biology*, 5, 444-449 (IF:4121)
18. 吉川智啓、三宅正人、藤田芳司 (2008) 創薬ターゲットとしてのプロテインキナーゼの網羅的解析、*実験医学増刊号 Vol.126*
19. 三宅淳、藤田聡史、三宅正人 (2007) トランスフェクションマイクロアレイと遺伝子ネットワーク解析技術、*機能材料*、27 (5), 45-52.
20. 佐藤孝明、三宅正人 (2007) 細胞・組織を用いたセンシング、*バイオセンサ・ケミカルセンサ事典、テクノシステム*
21. Fujita, S., Yamada, S., Hakamada, K., Miyake, M.*, Miyake, J. (2006) Development of Transfection Microarray and its Application. *Proceeding of UT Symposium on Nanobio Integration*, 1, 297-298.
22. 藤田聡史、三宅正人 (2006) セルアレイとその応用、*電気化学会誌*、74 (11), 899-904.
23. 三宅正人 (2006) リバーストランスフェクション、*遺伝子医学*、5, 135-140

学会発表

1. 三宅正人、遺伝子導入技術を基盤とした創薬支援事業の推進、「創薬研究支援ツールの高度化推進」発表交流会、大阪府大阪市、2009.12.18、(招待講演・口頭発表)
2. Fujita, S., Takano, K., Toyoda, C., Mika, N., Miyake, M., Screening and Identify of the siRNAs for Sensitizing TRAIL-Resistant HeLa Cells, *Asia Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC'09)*, Kobe, Hyogo, Japan, 2009. 11. 24-28, (Oral)
3. 佐野卓磨、固相トランスフェクションにおける抗インテグリン抗体の効果、*日本生物工学会セルプロセッシング計測評価研究部会第1回若手研究シンポジウム*、兵庫県神戸市、2009.11.26、(口頭発表)
4. 藤田聡史、High-Content Analysis の新展開、細胞運動評価チップを用いた細胞運動に関わる遺伝子のスクリーニング、*横河電機他5社共催セミナー*、東京都墨田区、2009.10.16、(招待講演)
5. 藤田聡史、高野幸太、樋田智都子、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、一細胞時系列計測によるTRAIL耐性HeLa細胞の感受化に関わるsiRNAの評価、*第61回日本生物工学会*、名古屋市千種区、2009.9.23-25、(口頭発表)
6. 高野幸太、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、TRAILによるアポトーシスモデルを用いたHeLa細胞の形質評価、*第61回日本生物工学会*、名古屋市千種区、2009.9.23-25、(口頭発表)
7. 三宅正人、関口さくら、藤田聡史、袴田和巳、三宅淳、培養条件の詳細制御による大規模遺伝子スクリーニング系の検討、*第61回日本生物工学会*、名古屋市、2009.9.23-25、(口頭発表)

8. 長崎（大貫）玲子、栗木直美、袴田和巳、長崎晃、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、細胞運動評価チップを用いた細胞運動に関わるキノームの解析、第 61 回日本生物工学会、名古屋市千種区、2009.9.23-25、（口頭発表）
9. 藤田聡史、固相トランスフェクション技術を用いた細胞時系列解析への展開、大阪府立大学 21 世紀科学研究所「ライブセルイメージング研究所」主催セミナー、大阪府堺市、2009.4.30、（招待講演）
10. Fujita, S., Transfection Microarray and its application for HTS, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, CA, USA, 2008. 12. 19 (Invited presentation)
11. 藤田聡史、山田茂、長崎玲子、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、固相トランスフェクション技術を用いた細胞の表現型解析、BMB2008（第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会）、兵庫県神戸市、2008.12.9-12
12. 大貫（長崎）玲子、栗城直美、袴田和巳、長崎晃、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、細胞チップを用いた細胞運動関連遺伝子群の網羅的探索、BMB2008（第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会）、兵庫県神戸市、2008.12.9-12、（ポスター発表）
13. 袴田和巳、藤田聡史、三宅淳、一細胞時系列解析を用いた細胞ダイナミクス解析手法の開発、第 46 回日本生物物理学会、福岡県福岡市、2008.12.3-5、（ポスター発表）
14. Hakamada, K., Fujita, S., Miyake, J., In silico synchronization: novel synchronization method without any stresses, 4th EMBO Conference: From Functional Genomics to Systems Biology, EMBL Heidelberg, Germany, 2008.11.15-18, (Poster)
15. Yoshida, H., Yamazaki, K., Takahashi, Y., Fujita, S., Miyake, J., Sugiyama, Y., Functional screening for genes related to cellular UV sensitivity using RNAi-based cell arrays, 25th IFSCC conference, Barcelona, Spain, 2008.10.6-9, (Poster)
16. 藤田聡史、山田茂、長崎玲子、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、固相トランスフェクション法を用いた細胞内分子ネットワーク解析、第 60 回日本生物工学会、宮城県仙台市、2008.8.27-29、（口頭発表）
17. 三宅正人、システムバイオロジー時代の細胞システム解析技術、第 60 回日本生物工学会、宮城県仙台市、2008.8.27-29、（招待講演・口頭発表）
18. 袴田和巳、藤田聡史、長棟輝行、三宅淳、一細胞時系列解析による細胞の動的挙動の解析、第 60 回日本生物工学会、宮城県仙台市、2008.8.27-29、（口頭発表）
19. Fujita, S., Onuki-Nagasaki, R., Yamada, S., Hakamada, K., Miyake, M., Miyake, J., The development of phenotypic screening method for cancer specific apoptosis and cancer cell migration based on transfection microarray (TMA), Second JCA-AACR Special Joint Conference; The Latest Advances in Breast Cancer Research From Basic Science to Therapeutics, Awaji Island, Hyogo, Japan, 2008. 7. 14-16, (Poster)
20. 藤田聡史、トランスフェクションマイクロアレイ技術をベースとした遺伝子機能解析への展開、日本サイトメトリー学会、東京都港区、2008. 6. 29、（招待講演・口頭発表）
21. 三宅正人、トランスフェクションマイクロアレイ技術と応用、第 49 回日本臨床細胞学会シンポジウム、東京都品川区、2008. 6. 7、（招待講演・口頭発表）
22. Takahashi, Y., Yoshida, H., Yamazaki, K., Fujita, S., Miyake, J., Moriwaki, S., Sugiyama, Y. Exploration of double strand DNA break repair gene associated with UV response using reverse transfection of siRNAs from solid surface, Cellular Responses to DNA Damage 2008 Conference, Boston, MA, USA, 2008. 5. 29, (Poster)
23. Fujita, S., In vivo selection of biotin protein ligase using novel phage display method, Biosensors 2008, Shanghai, China, 2008. 5. 14-16, (Poster)
24. Yamada, S., Hakamada, K., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J., Development of neuronal cell array for

- gene and chemical profiling, Biosensors 2008, Shanghai, China, 2008. 5. 14-16, (Poster) *Presenter
25. Hakamada, K., Fujita, S., Miyake, J., In silico synchronization: novel synchronization method without any stresses, Biosensors 2008, Shanghai, China, 2008. 5. 14-16, (Poster)
 26. Yoshida, H., Yamazaki, K., Takahashi, Y., Fujita, S., Miyake, J., Moriwaki, S., Sugiyama, Y., High-throughput screening for gene function related to UV response using reverse transfection of siRNAs from solid surface, The International Investigative Dermatology 2008, Kyoto, Japan, 2008.5. 14-17, (Poster)
 27. 袴田和巳、藤田聡史、三宅淳、一細胞時系列を用いた細胞状態把握、日本化学会第 88 回春季年会、神奈川県横浜市、2008.3.26-30、(口頭発表)
 28. 三宅正人、トランスフェクションマイクロアレイ技術と創薬への展開：バイオベンチャー創出の一例として、茨城大学第 5 回遺伝子実験施設公開シンポジウム、茨城県つくば市、2008. 3. 18、(招待講演・口頭発表)
 29. 藤田聡史、TFA(Transfection Array)の開発とその応用、山口大学医学部、山口県宇部市、2008.3.7、(招待講演)
 30. 三宅正人、動物(ヒト)細胞への固相系遺伝子導入技術とその応用、平成 19 年度第 2 回東工大バイオ計測研究会、神奈川県横浜市、2008. 3.6、(招待講演・口頭発表)
 31. 藤田聡史、三宅正人、三宅淳、固相トランスフェクション法を用いた遺伝子機能解析ツールの開発と応用、ライフサイエンス分野融合会議ライフサイエンス部会・バイオテクノロジー分科会 合同研究発表会「健康サービス産業の創出に向けて」、ライフサイエンス分野融合会議、茨城県つくば市、2008.1.31-2.1、(ポスター)
 32. 三宅正人、細胞解析技術と創薬への展開、第 5 回ライフサーベイヤーシンポジウム、愛知県名古屋市、2008.1.31、(招待講演・口頭発表)
 33. Fujita, S., Miyake, M., Miyake, J., High efficient reverse transfection from solid surface and its applications, AIST (Japan)- DBT (India) Workshop & International AIST Symposium on Understanding and Manipulating Stress, Aging and Cancer, AIST & DBT, Tsukuba, Japan, 2008. 1. 22, (Poster)
 34. Fujita, S., Development of transfection microarray and its applications for identification of gene functions, 理化学研究所主催セミナー、神奈川県川崎市、2007.12.26、(招待講演)
 35. 袴田和巳、藤田聡史、三宅淳、一細胞時系列を用いた in silico 細胞周期同調法の開発、第 45 回生物物理学会年会、神奈川県横浜市、2007.12.21-23、(口頭発表)
 36. 藤田聡史、袴田和巳、山田茂、長崎玲子、三宅正人、三宅淳、固相トランスフェクション法を用いた遺伝子機能解析ツールの開発と応用、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会、合同大会 (BMB2007)、神奈川県横浜市、2007.12.11-15、(口頭発表 & ポスター)
 37. 大貫(長崎)玲子、長崎晃、藤田聡史、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションアレイ技術を用いた細胞運動性評価チップの開発、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会、合同大会 (BMB2007)、神奈川県横浜市、2007.12.11-15、(口頭発表)
 38. Fujita, S., Ota, M., Miyake, M., Miyake, J., Highly Efficient Reverse Transfection with siRNA in Multiple Wells of Microtiter Plates, ASCB 2007 47th Annual Meeting, Washington DC, USA, 2007.12.1-5, (Poster)
 39. Yamada, S., Fujita, S., Miyake, M., Miyake, J., Retinoic Acid induces Functional c-Ret Tyrosine Kinase in Human, ASCB 2007 47th Annual Meeting, Washington, DC, USA, 2007. 12. 1-5, (Poster)
 40. 斉藤総一郎、藤田聡史、三宅淳、平野隆、BAC array CGH 法を用いた乳がん細胞株の解析、第 66 回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2007.10.3-5、(ポスター発表)
 41. 藤田聡史、太田英史、佐々木智恵、高野幸太、三宅正人、三宅淳、siRNA のリバーストランスフェクション技術の開発、第 59 回日本生物工学会、東広島市、2007.9.25-27、(口頭発表)
 42. 袴田和巳、木原隆典、徳元康人、藤田聡史、長棟輝行、三宅淳、細胞状態規定のための一細

- 胞時系列解析、第 59 回日本生物工学会、広島県東広島市、2007.9.25-27、(口頭発表)
43. 三宅正人、セルインフォマティクスと創薬への展開、関西バイオの未来を考える会ワークショップ、大阪府大阪市、2007.7.13、(招待講演・口頭発表)
 44. 三宅正人、セ化合物プロファイリングに応用できるトランスフェクションマイクロアレイ、日本化学工学会展望講演会、茨城県つくば市、2007.7.13、(招待講演・口頭発表)
 45. 藤田聡史、ヒト遺伝子機能解析ツールの開発とその応用、「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」ワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术 — 遺伝子の森から創薬を見る —」、東京都千代田区、2007.5.31、(招待講演・口頭発表)
 46. 袴田和巳、藤田聡史、三宅淳、時系列一細胞解析技術を用いた細胞周期と遺伝子発現の相関解析、「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」ワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术 — 遺伝子の森から創薬を見る —」、東京都千代田区、2007.5.31、(ポスター発表)
 47. 山田茂、内村英一郎、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、マイクロアレイトランスフェクションにおける細胞表面層蛋白の抗体の影響、「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」ワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术 — 遺伝子の森から創薬を見る —」、東京都千代田区、2007.5.31、(ポスター発表)
 48. 大貫(長崎)玲子、長崎晃、藤田聡史、太田英史、高野幸太、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションアレイを用いた標的探索法、「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」ワークショップ「ターゲット遺伝子探索の新技术 — 遺伝子の森から創薬を見る —」、東京都千代田区、2007.5.31、(ポスター発表)
 49. 藤田聡史、トランスフェクションマイクロアレイの開発と細胞解析への応用、大阪府立大学 21 世紀科学研究所「ライブセルイメージング研究所」主催セミナー、大阪府堺市、2007.5.22、(招待講演)
 50. 藤田聡史、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションマイクロアレイの開発と創薬ターゲット遺伝子同定への応用、日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋市熱田区、2006.12.6-8、(ポスター発表)
 51. Fujita, S., Yamada, S., Hakamada, K., Miyake, M., Miyake, J., Development of transfection microarray and its application, UT Symposium on NanoBio Integration; NANOBIO-TOKYO 2006, Bunkyo-ku Tokyo, Japan 2006.12.4-7, (Poster)
 52. 三宅淳、藤田聡史、三宅正人、細胞チップを用いた遺伝子パスウェイ解析と分化誘導技術への応用、第 28 回日本バイオマテリアル学会、東京都千代田区、2006.11.27-28、(招待公演・口頭発表)
 53. Hakamada, K., Fujita, S., Miyake, J., Relation between Cell Division and Gene Expression by Using Single Cell Tracking System, GIW 2006; The 17th International Conference on Genome Informatics, Yokohama, Japan 2006.11.18-20, (Poster)
 54. Fujita, S., Yamada, S., Hakamada, K., Miyake, M., Miyake, J., Development of transfection microarray and its applications for identification of gene functions, The 3rd EMBL/EMBO Biennial Symposium; From Functional Genomics to Systems Biology, EMBL Heidelberg, Germany, 2006.10.14-17, (Poster)
 55. 長崎(大貫)玲子、長崎晃、藤田聡史、高野幸太、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションアレイ技術を用いた細胞運動性評価チップの開発、第 59 回日本生物工学会、広島県東広島市、2006.9.25-27、(口頭発表)
 56. 袴田和巳、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションアレイシステムを用いたシグナルパスウェイの探索手法の開発、第 58 回日本生物工学会、大阪府豊中市、2006.9.11-13、(口頭発表)

57. 藤田聡史、藤原有希、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションマイクロアレイの開発とパスウェイ解析への応用、第 58 回日本生物工学会、大阪府豊中市、2006.9.11-13、(口頭発表)
58. 山田茂、内村英一郎、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、マイクロアレイトランスフェクションにおける細胞表層蛋白の抗体の影響、第 58 回日本生物工学会、大阪府豊中市、2006.9.11-13、(口頭発表)
59. 平野隆、斉藤総一郎、森田桂子、藤田聡史、三宅淳、ヒト乳ガン細胞株の BAC array CGH 解析、第 24 回日本ヒト細胞学会、東京都千代田区、2006.7.30-31、(ポスター)
60. 藤田聡史、三宅正人、三宅淳、トランスフェクションマイクロアレイの開発とガン細胞解析への応用、日本サイトメトリー学会、長崎県長崎市、2006. 7. 8、(招待講演・口頭発表)
61. 藤田聡史、トランスフェクションマイクロアレイの開発とその応用例、遺伝子・デリバリー研究会、神奈川県箱根町、2005. 8. 1、(口頭発表)

特許

1. 名称：薬剤が細胞に与える影響を評価するシステム、出願番号：特願 2009-217535、出願日：2009.9.18、出願人：産業技術総合研究所、発明者：藤田聡史(80)／高野幸太(20)
2. 名称：細胞運動性評価セルチップ、出願番号：特願 2007-144215、出願日：2007.5.30、公開番号：特開 2008-295351、公開日：2009.12.11、PCT 番号：WO2008/149809、PCT 出願日：2008.12.11、出願人：産業技術総合研究所、発明者：藤田聡史(30)／長崎晃(30)／三宅淳(20)／長崎玲子(15)／三宅正人(5)

受賞

1. トランスフェクションアレイシステムの開発、2007 年、(第 15 回)「化学・バイオつくば賞」受賞、三宅正人、吉川智啓、内村 英一郎、藤田聡史、三宅淳
2. 固相トランスフェクションにおける抗インテグリン抗体の効果、2009 年、Young Researcher's Award (研究奨励賞) 博士研究者部門. 日本生物工学会セルプロセッシング計測評価研究部会第 1 回若手研究シンポジウム、佐野卓磨

2. 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター

論文

1. "Serial Network Inference in Cell Cycle Regulation on Yeast", Aburatani, S. and Horimoto, K., The 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings, Vol. 4, pp. 1-6, 2006.7.
2. "A graphical chain model for inferring regulatory system networks from gene expression profiles", Aburatani, S., Saito, S., Toh, H. and Horimoto, K. Statistical Methodology, 3, 17-28, (2006).
3. "Symbolic-numeric estimation of parameters in biochemical models by quantifier elimination", Anai, H., Orii, S. and K. Horimoto, K., J. Bioinfo. Comp. Biol. 4, 1097-1117, (2006).
4. "Protein threading with profiles and distance constraints using clique based algorithms", Bahadur, K.C.D., Tomita, E., Suzuki, J., Horimoto, K. and Akutsu, T. J. Bioinfo. Comp. Bio., 4, 19-42, (2006)
5. "Partial correlation coefficient between distance matrices as a new indicator of protein-protein interactions", Sato, T., Yamanishi, Y., Horimoto, K., Kanehisa M. and Toh, H.: Bioinformatics, 22, 2488-2492, (2006).
6. "Inference of Scale-free Networks From Gene Expression Time Series", Tominaga, D. and Horton, P., Journal of Bioinformatics and Computational Biology, Vol. 4, No. 2, pp. 503-514, 2006.4.
7. "Non-Arbitrary Judgment Algorithm for Periodicity of Time Series", Tominaga, D. and Horton, P., The

- 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings, Vol. 4, pp. 17-22, 2006.7.
8. Tominaga, D., Horton, P.: Inference of Scale-free Networks From Gene Expression Time Series, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, Vol. 4, No. 2, pp. 503-514, 2006.
 9. Tominaga, D., Horton, P.: Non-Arbitrary Judgment Algorithm for Periodicity of Time Series, *The 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings*, Vol. 4, No. 1, pp. 17-22, 2006.
 10. Aburatani, S., Saito, S., Toh, H. and Horimoto, K.: A graphical chain model for inferring regulatory system networks from gene expression profiles. *Statistical Methodology*, 3, 17-28, 2006.
 11. Sato, T., Yamanishi, Y., Horimoto, K., Kanehisa, M. and Toh, H.: Partial correlation coefficient between distance matrices as a new indicator of protein-protein interactions. *Bioinformatics* 22, 2488-2492, 2006.
 12. Anai, H., Orii, S. and Horimoto, K.: Symbolic-numeric estimation of parameters in biochemical models by quantifier elimination *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, Vol. 4, No. 4, pp. 1097-1117, 2006.
 13. Yoshida, H., Anai, H. and Horimoto, K.: Derivation of Rigorous Relationships between Proliferation and Transition Rates of Multiple Cells by Algebraic Approach, *10th World MultiConference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings*. 4, 1-6, 2006
 14. Bahadur, K.C.D., Tomita, E., Suzuki, J., Horimoto, K. and Akutsu, T.: Protein threading with profiles and distance constraints using clique based algorithms, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, Vol. 4, No. 1, pp. 19-42, 2006.
 15. Sato, T., Yamanishi, Y., Horimoto, K., Kanehisa, M. and Toh, H.: Inference of Protein-Protein Interactions by Using Co-evolutionary Information. In Anai, H., Horimoto, K. and Kutsia, T. (eds), *Algebraic Biology 2007, Lecture Notes in Computer Science 4545*, 322-333, Springer, Heidelberg.
 16. Yoshida, H., Nakagawa, K., Anai, H. and Horimoto, K.: Exact parameter determination for Parkinson's disease diagnosis with PET using an algebraic approach. In Anai, H., Horimoto, K. and Kutsia, T. (eds), *Algebraic Biology 2007, Lecture Notes in Computer Science 4545*, 110-124, Springer, Heidelberg.
 17. Aburatani, S.: Inference of Complex Regulatory Network for the Cell Cycle System in *Saccharomyces cerevisiae*. In Anai, H., Horimoto, K. and Kutsia, T. (eds), *Algebraic Biology 2007, Lecture Notes in Computer Science 4545*, Springer, Heidelberg
 18. Aburatani, S.: ASIAN : A Network Inference Web Server for Biologists, the 11th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings, Vol.4, 1-6, 2007.
 19. Tominaga, D., Horimoto, K.: Symbolic approach for dynamical analysis of biological network modules, *11th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings*, Vol.4, 25-29, 2007.
 20. Tominaga, D., Iguchi, F., Akiyama, Y., Horimoto, K.: Development of automated image processing procedure for cell-arrays, *11th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics Proceedings*, Vol.4, 19-24, 2007.
 21. Aburatani, S., Saito, S., and Horimoto, K., ASIAN: Automatic System for Inferring A Network. In Krawetz, S. (ed): *Bioinformatics for Systems Biology: Second Edition, Introduction to Informatics*, The Humana Press, New Jersey. (in press)
 22. Yoshida, H., Anai, H. and Horimoto, K.: Derivation of rigorous conditions for high cell-type diversity by algebraic approach. *BioSystems*, Vol.90, 486-495, 2007.
 23. Aburatani, S., Sun, F., Saito, S., Honda, M., Kaneko, S. and Horimoto, K.: Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical Gaussian model.

- EURASIP J. Bioinfo. Systems Biol. 47214, 2007.
24. Tominaga, D., Iguchi F., Akiyama Y., Horimoto, K.: High-throughput Automated Image Processing System for Cell Array Observations, IPSJ Transactions of Bioinformatics, Vol. 48, SIG 17, 1-7, 2007.
 25. Yoshida, H., Horimoto, K. and Anai, H.: Inference of Probabilities over a Stochastic IL-System by Quantifier Elimination. *Math.Comput.Sci.*, 1, 473-485, 2008. 2008/04/01
 26. Nishino, R., Honda, M., Yamashita, T., Takatori, H., Minato, H., Zen, Y., Sasaki, M., Takamura, H., Horimoto, K., Ohta, T., Nakanuma and Y., Kaneko, S.: Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.*, 49, 207-216, 2008. 2008/06/01
 27. Hayashida, M., Sun, F., Aburatani, S., Horimoto, K. and Akutsu, T.: Integer Programming-based Approach to Allocation of Reporter Genes for Cell Array Analysis. *Int. J. Bioinformatics Research and Applications*, 4, 385-399, 2008. 2008/08/01
 28. Saito, S., Aburatani, S. and Horimoto, K.: Network evaluation from the consistency of the graph structure with the measured data. *BMC Sys. Biol.* 2, 84, 2008. 2008/10/01
 29. Ura, S., Honda, M., Yamashita, T., Ueda, T., Takatori, H., Nishino, R., Sunagozaka, H., Sakai, Y., Horimoto, K. and Kaneko, S.: Differential miRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to HCC. *Hepatology*, 49, 1098-1112, 2009.
 30. Tominaga, D., Tokumoto, Y., Nakatsui, M., Sun, F., Miyake, J. and Horimoto, K.: Analysis of network dynamics including hidden variables by symbolic-numeric approach. *Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08)*, pp. 242-248, 2008. 2008/11/01
 31. Morioka, R., Arita, M., Sakamoto, K., Kawaguchi, S., Tei, H. and Horimoto, K.: Phase Shifts of Circadian Transcripts in Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08)*, pp. 109-114, 2008. 2008/11/01
 32. Nakatsui, M., Yoshida, H. and Horimoto, K.: An Algebraic-Numeric Algorithm for the Model Selection in Network Motifs in *Escherichia coli*. *Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08)*, pp. 257-264, 2008. 2008/11/01
 33. Zhang, Z.Y., Horimoto, K. and Liu, Z.: Time Series Segmentation for Gene Regulatory Process with Time-Window-Extension Technique. *Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08)*, pp. 198-203, 2008. 2008/11/01
 34. Wu, Z.K., Zhang, Z.Y., Zhang, L.W. and Horimoto, K.: Revealing Disease Related Interactions by Correlation Analysis. *Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08)*, pp. 341-349, 2008. 2008/11/01
 35. Nakatsui, M., Horimoto, K., Okamoto, M., Tokumoto, Y. and Miyake, J.: Parameter Optimization in the network dynamics including unmeasured variables by the symbolic-numeric approach. *BMC Sys. Biol.* in press.
 36. “恣意的な判断基準を持たない時系列データの周期性判定法”, 富永大介, Paul Horton, 情報処理学会研究報告, Vol. 2006, No. 13, pp. 17-23, 2006.5.

総説等

37. Anai, H., Horimoto, K. and Kutsia, T. (eds) *Algebraic Biology*, Lecture Notes in Computer Science 4545, Springer, Heidelberg, 2007.
38. Horimoto, K., Regensburger, G., Rosenkranz, M. and Yoshida, H. (eds): *Algebraic Biology*, Lecture Notes in Computer Science 5147, Springer, Heidelberg, 2008.
39. Aburatani, S., Saito, S., and Horimoto, K.: ASIAN: Automatic System for Inferring A Network. In Krawetz, S. (ed): *Bioinformatics for Systems Biology: Second Edition, Introduction to Informatics*,

p.563-577, Humana Press, New Jersey, 2009.

40. Anai, H. and Horimoto, K. (eds): Symbolic Computation in Biology, Math. Comput. Sci., 2, 399-556, 2009.

特許

1. Periodicity judgment apparatus, periodicity judgment method and periodicity judgment program, US_11/374977 (applied on 2006.3.15)

学会発表 (国際学会)

1. "Orchestration of gene systems inferred from expression profiles by graphical chain model", Aburatani, A., Saito, S., Honda, M., Kaneko, S. and Horimoto, K., 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June 23, 2006, Kyoto, Japan.
2. "Serial Network Inference in Cell Cycle Regulation on Yeast", Aburatani, S. and Horimoto, K., The 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, 米オーランド, 2006.7.
3. "On consistency of biological network model with measured data", Horimoto, K., 2nd Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Bioinformatics, 8 November, 2006, Seiko University, Tainan, Taiwan.
4. "Non-Arbitrary Judgment Algorithm for Periodicity of Time Series", Tominaga, D. and Horton, P., The 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, 米オーランド, 2006.7.
5. "Derivation of Rigorous Relationships between Proliferation and Transition Rates of Multiple Cells by Algebraic Approach", Yoshida, H., Anai, H. and Horimoto, K., The 10th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics: WMSCI 2006, July 17, 2006, Orlando, USA.
6. Horimoto, K.: On consistency of biological network model with measured data, 2nd Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Bioinformatics, 2006
7. Aburatani, A., Saito, S., Honda, M., Kaneko, S. and Horimoto, K.: Orchestration of gene systems inferred from expression profiles by graphical chain model, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.
8. Tominaga, D., Tokumoto, Y., Nakatsui, M., Sun, F., Miyake, J. and Horimoto, K.: Analysis of network dynamics including hidden variables by symbolic-numeric approach. The Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08), Lijiang, China, October 31– November 3, 2008/11/01
9. Morioka, R., Arita, M., Sakamoto, K., Kawaguchi, S., Tei, H. and Horimoto, K.: Phase Shifts of Circadian Transcripts in Rat Suprachiasmatic Nucleus. The Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08), Lijiang, China, October 31– November 3, 2008. 2008/11/01
10. Nakatsui, M., Yoshida, H. and Horimoto, K.: An Algebraic-Numeric Algorithm for the Model Selection in Network Motifs in Escherichia coli. The Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08), Lijiang, China, October 31– November 3, 2008. 2008/11/01
11. Zhang, Z.Y., Horimoto, K. and Liu, Z.: Time Series Segmentation for Gene Regulatory Process with Time-Window-Extension Technique. The Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08), Lijiang, China, October 31– November 3, 2008. 2008/11/01
12. Wu, Z.K., Zhang, Z.Y., Zhang, L.W. and Horimoto, K.: Revealing Disease Related Interactions by Correlation Analysis. The Second International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB'08), Lijiang, China, October 31– November 3, 2008. 2008/11/01
13. Horimoto, K.: Network Inference and Evaluation Based on Graphical Model. "Seminar on Computational Systems Biology", Institute of Systems Biology, Shanghai University, Aug. 11-18, 2008.

2008/08/13

(国内学会)

14. 富永大介、ポール・ホートン: 情報量基準による遺伝子発現時系列の周期性判定法, 日本分子生物学会第 28 回年会, 福岡, 2005.
15. 富永大介、ポール・ホートン: 遺伝子発現時系列の周期性の有無についての自動判別法, JSBi 第一回プロテイン・インフォマティクス in 九州, 福岡, 2005.
16. 富永大介、ポール・ホートン: 遺伝子発現時系列の周期性の情報量基準による全自動判定, 産総研 生命情報科学人材養成コース, 東京, 2005.
17. 富永大介、ポール・ホートン: ベイズ情報量基準による遺伝子発現時系列の周期性判定法, 第 15 回日本数理生物学会大会, 横浜, 2005.
18. 富永大介: 細胞アレイ装置による遺伝子発現時系列の観測とその方法, 生命情報科学研究センターシンポジウム (CBRC206), 東京, 2006.
19. 富永大介: 細胞アレイ装置のための大規模画像処理技術開発, 生命情報科学研究センターシンポジウム (CBRC206), 東京, 2006
20. 富永大介、ポール・ホートン: 恣意的な判断基準を持たない時系列データの周期性判定法、情報処理学会平成 17 年度第 4 回バイオ情報学研究会, 札幌, 2006.
21. 富永大介、ポール・ホートン: 遺伝子発現時系列データからの周期性変動抽出の自動化、平成 17 年度 ライフサイエンス分野融合会議・生命工学部会バイオテクノロジー研究会合同研究発表会・講演会, つくば, 2006.
22. "細胞アレイのための大規模画像処理システムの開発", 富永大介, 井口富久美, 堀本勝久, 情報処理学会第 8 回バイオ情報学研究会, 大阪, 2007.3
23. 堀本勝久: 2 つアプローチによる時間発展するネットワーク構造変化解析, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム 4S8「動的ネットワーク構造探索の計算イニシアティブ」, 2008 年 12 月 12 日, 神戸ポートピアホテル・南館
24. 堀本勝久: 進展型疾患のネットワークモデル, 医療と情報技術の連携イノベーションフォーラム, 2008 年 12 月 2 日, 東京大学本郷キャンパス工学部新 2 号館 213 大講義室

3. 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 (つくば、レヌー氏グループ)

(尚、同部門 (つくば) 平野氏グループの成果は山口大学の項に記載)

論文

1. Deocaris, C. C., Widodo, N., Wadhwa, R., and Kaul, S. C. (2008) Merger of ayurveda and tissue culture-based functional genomics: Inspirations from systems biology. *J. Translational Medicine* 6: 14.
2. Hasan, M. K., Yaguchi, T., Harada, J. I., Hirano, T., Wadhwa, R., and Kaul, S. C. (2008) CARF (collaborator of ARF) interacts with HDM2: Evidence for a novel regulatory feedback regulation of CARF-p53-HDM2-p21WAF1 pathway. *Int. J. Oncol.* 32: 663-671.
3. Deocaris, C. C., Takano, S., Priyandoko, D., Kaul, Z., Yaguchi, T., Kraft, D. C. Yamasaki K., Kaul S. C., and Wadhwa, R. (2008) Glycerol stimulates innate chaperoning, proteasomal and stress-resistance functions implications for geronto-manipulation. *Biogerontology* 9: 269-282.
4. Widodo, N., Takagi, Y., Shrestha, B. G., Ishii, T., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2008) Selective killing of cancer cells by leaf extract of Ashwagandha: Components, activity and pathway analyses. *Cancer Lett.* 262: 37-47.
5. Deocaris, C. C., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2008) From proliferative to neurological role of an hsp70 stress chaperone, mortalin. *Biogerontology* 9: 391-403.

6. Cheung, C. T., Hasan, M. K., Widodo, N., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2009) CARF: An emerging regulator of p53 tumor suppressor and senescence pathway. *Mech Ageing Dev.* 130:18-23.
7. Deocaris, C. C., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2009) The versatile stress protein mortalin as a chaperone therapeutic agent. *Protein & Peptide Lett.* (in press).
8. Hasan, M. K., Cheung, C., Kaul, Z., Sakaushi, S., Sugimoto, K., Oka, S., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2009) CARF is a vital dual regulator of cellular senescence and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 284:1664-1672.
9. Tamang, D.L., Alves, B., Elliott, V., Redelman, D., Wadhwa, R., Fraser, S. and Hudig, D. (2009) Regulation of perforin lysis: Implications for protein disulfide isomerase proteins. *Cellular Immunology* 255: 82-92.
10. Gupta, A. Yang, Q., Pandita, R. K., Hunt, C. R., Xiang, T., Misri, S., Zeng, S., Pagan, J., Puc, J., Kumar, R., Sharan, S.K., Feng, Z., Powell, S., Bhat, A., Gonzalo, S., Yaguchi, T., Wadhwa, R., Kaul, S.C., Kelley, J., Parsons, R., Khanna, K. K., Pandita, T.K. (2009) Defects in cell cycle checkpoints contribute to genomic instability in PTEN deficient cells independent of DNA damage response. *Cell Cycle* 8:2198-2210.
11. Widodo, N., Shah, N. Kaul, S. C, Wadhwa, R. (2009) Deceleration of senescence in normal human fibroblasts by Withanone extracted from Ashwagandha leaves. *J Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64A:1031-1038.
12. Shah, N., Kataria, H., Kaul, S.C., Kaur, G and Wadhwa, R. (2009) Effect of the alcoholic extract of Ashwagandha leaves and its components on proliferation and differentiation of glioblastoma cells: a combinational formula for enhanced differentiation. *Cancer Science* 100: 1740-1747.
13. Cheung, C. T., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2009) Molecular bridging of aging and cancer: A CARF link. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (in press).
14. Marrow, G., Kim, H.J, Pécheur, M.L., Kaul, S.C., Wadhwa, R. and Tanguay, R.M. (2009) Protection from aging by small chaperones: a trade-off with cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (in press).
15. Kataria, H, Shah, N, Kaul, S. C., Wadhwa, R. and Kaur, G (2009) Water extract of Ashwagandha leaves limits proliferation and migration and induces differentiation in glioma cells. *eCAM* (in press)
16. Wadhwa, R., Ryu , J., Choi, I., Morrow, G., Rajput, K., Hang, H. T., Kaul, S.C., Yun, C., Tanguay, R. M. (2009) Pro-proliferative Functions of Drosophila Small Mitochondrial Heat Shock Protein 22 in Human Cells. *J Biol. Chem.* (in press).

学会発表 (国際学会)

(口頭発表)

1. Wadhwa, R. (2008) Molecular bridging of aging and cancer: Basic and interventional studies leading to development of tools and technologies. Indo-Japan Symposium on Glycoscience, Cell Engineering and Bioinformatics, Hyderabad, India November 25-26, 2008.
2. Wadhwa, R. (2008) Mortalin in neurodegenerative disorders and cancer. International Symposium on "Molecular Aspects of Brain Aging and Neurological Disorders and Annual Meeting of Society for Neurochemistry, Guru Nanak Dev University, India, November 28-29, 2008.
3. Wadhwa, R. (2008) Stress protein mortalin and human carcinogenesis. Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), India, November 24, 2008.
4. Wadhwa, R. (2008) From identification to intervention of a novel protein. Inaugural Talk. Workshop on basic neurochemical techniques for young neuroscientists. GNDU, Amritsar, 17-27 Nov, 2008.
5. Wadhwa, R. (2008) Biotechnology and Biosafety. Workshop on basic neurochemical techniques for young neuroscientists. GNDU, Amritsar, 17-27 Nov, 2008.

6. Wadhwa, R. (2008) Electrophoresis based technologies. Workshop on basic neurochemical techniques for young neuroscientists. GNDU, Amritsar, 17-27 Nov, 2008.
7. Wadhwa, R. (2008) Literature survey tool-EndNote. Workshop on basic neurochemical techniques for young neuroscientists. GNDU, Amritsar, 17-27 Nov, 2008.
8. Kaul, S. (2008) Ashwagandha leaf extract and diseases of old. International Symposium on Molecular aspects of brain aging and neurological disorders and Annual meeting of society for neurochemistry, India 28-29 Nov, 2008.
9. Kaul, S. (2008) Nanotechnology and Imaging. Inaugural Talk. Workshop on basic neurochemical techniques for young neuroscientists. GNDU, Amritsar, 17-27 Nov, 2008.
10. Wadhwa, R. (2008) Molecular bridging of aging and cancer: Basic and interventional studies leading to development of tools and technologies. Indo-Japan Symposium on Glycoscience, Cell Engineering and Bioinformatics, Hyderabad, India, November 25-26, 2008.
11. Wadhwa, R. (2009) Mortalin based cancer diagnostics and therapeutics. Biomarkers for early detection of cancers: Technological advances and clinical readiness. Croucher Advanced Study Institute, Cheung Kung Hai Conference Center, LKS Faculty of Medicine, HKU Hong Kong, March 30-April 3.
12. Wadhwa, R. (2009) Molecular bridging of aging and cancer. 13th Congress International Association of Biogerontology 2009: Aging, cancer and age-related diseases: common mechanisms. Quebec, Canada, May 18-20
13. Wadhwa, R. (2009) Stress protein mortalin-based cancer therapeutics. AIST-CNRS bilateral workshop in life sciences. Institute of Biological Sciences, CNRS, Paris, Sept 24, 2009.
14. Kaul, S. (2009) Molecular mechanism of anti-cancer effects of Ashwagandha leaf extract. AIST-CNRS bilateral workshop in life sciences. Institute of Biological Sciences, CNRS, Paris, Sept 24, 2009
15. Wadhwa, R. (2009) Stress protein mortalin- a dual regulator of age diseases, cancers and neurodegeneration. XXVII Annual conference of Indian Academy of Neurosciences, NIMS University, Jaipur, India Dec 18-20, 2009.
16. Kaul S. (2009) Molecular insights into the Ashwagandha based therapies- a focus on cancer and neurodifferentiation. XXVII Annual conference of Indian Academy of Neurosciences, NIMS University, Jaipur, India Dec 18-20, 2009.

(ポスター発表)

17. Kaur, K., Widodo, N, Bala, S., Shah, N., Wadhwa, R. and Kaul, S. (2008) Effect of Ashwagandha leaf extract on brain cancer derived cells: possible combinatorial cancer therapeutical approach. International Symposium on "Molecular Aspects of Brain Aging and Neurological Disorders and Annual Meeting of Society for Neurochemistry, Guru Nanak Dev University, India, November 28-29, 2008.
18. Shah, N., Kataria, H., Kaur, G., Wadhwa, R. and Kaul, S. (2008) Differentiation of glioma cells by Ashwagandha leaf extract and its components. International Symposium on "Molecular Aspects of Brain Aging and Neurological Disorders and Annual Meeting of Society for Neurochemistry, Guru Nanak Dev University, India, November 28-29, 2008.
19. Shah N., Ishii T., Wadhwa R., Kaul S. (2009) Differentiation of Human Glioma Cells by Ashwagandha Leaf Extract and its Components. 2ND China-Japan Graduate Student forum on Life, Environment and Energy 24-28th Sept' 09; Proceedings (Page 20-23).
20. Gao R., Ishii T., Kaul S., Wadhwa R. (2009) Candidate Anti-cancer shRNA Identified by Mortalin Staining Reporter. . 2ND China-Japan Graduate Student forum on Life, Environment and Energy 24-28th Sept' 09; Proceedings (Page 12-16)
21. Saxena N., Shreshta B., Ishii T., Kaul S., Wadhwa R. (2009) Mortalin-Bcl2 Interaction Acts as a Tumor

Suppressor Mechanisms in Cancer Cells. 2ND China-Japan Graduate Student forum on Life, Environment and Energy 24-28th Sept' 09; Proceedings (Page 42-45)

22. Priyandoko, D., Widodo, N., Ishii, T., Wadhwa, R. and Kaul, S. (2009) Molecular effects of methoxyacetic acid on human skin fibroblast cells. ICBS BIO UGM 2009 (international Conference on Biological Science). Faculty of Biology, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia, October 16 - 17, 2009.

(国内学会)

(口頭発表)

1. Wadhwa, R. Stress chaperone mortalin in cellular senescence and carcinogenesis: from its identification, cloning to interventions. The 1st Japan-India Bilateral Symposium on Bioinformatics, AIST Tokyo Waterfront, Tokyo, November 6, 2008.
2. Wadhwa, R. (2008) Cellular aging, a checkpoint to cancer: molecular and interventional aspects including an Ayurvedic approach. 30th Seminar at the International Research and Educational Institute for Integrated Medical Sciences (IREIIMS), Tokyo Women's Medical University, Tokyo, August 18, 2008.
3. Wadhwa, R. (2009) Mortalin/mthsp70 dampens down the activities of tumor suppressor protein p53 in human cancers. The Fourth International Congress on Stress Response in Biology and Medicine. Sapporo, Japan, Oct 6-9, 2009
4. Wadhwa, R. (2009) Studies on the control of proliferation and its intervention in human normal and cancer cells. 3rd Japan (AIST)-India (DBT) Symposium on Glycoscience, Bioinformatics & Cell Engineering. AIST, Japan, Oct 27, 2009
5. Wadhwa, R. (2009) Molecular Biology of the traditional solutions of cancer. 20th Asia Pacific Cancer Conference. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov 12-14, 2009

(ポスター発表)

6. Caroline, C., Hasan, K, Wadhwa, R. and Kaul, S. (2008) CARF plays a vital role in replicative & stress-induced senescence of human cells. The 1st Japan-India Bilateral Symposium on Bioinformatics, AIST Tokyo Waterfront, Tokyo, November 6, 2008.
7. Jihoon, R., Yaguchi, T. Il-Kyu, C, Yun, C and Kaul, S. and Wadhwa, R. (2008) BST-2: a novel mediator of drug resistance of cancer cells. The 1st Japan-India Bilateral Symposium on Bioinformatics, AIST Tokyo Waterfront, Tokyo, November 6, 2008.
8. Shah, N, Kaur, G, Wadhwa, R. and Kaul, S. (2008) Neuroprotective potential of Ashwagandha leaf extract. The 1st Japan-India Bilateral Symposium on Bioinformatics, AIST Tokyo Waterfront, Tokyo, November 6, 2008.
9. Caroline, C., Hasan, K, Shah, N., Kaul, S. and Wadhwa, R. (2008) stress-induced senescence and apoptosis are regulated by carf in human cells. The Fourth International Congress on Stress Response in Biology and Medicine. Sapporo, Japan, Oct 6-9, 2009
10. Yaguchi, T., Ryu, J., Yun, A., Yun, Ch., Wadhwa, R. and Kaul, S. (2009) Mortalin translocates from mitochondria to nucleus and promotes human tumorigenesis. The Fourth International Congress on Stress Response in Biology and Medicine. Sapporo, Japan, Oct 6-9, 2009
11. Caroline, C., Hasan, K, Shah, N., Kaul, S. and Wadhwa, R. (2008) CARF plays a vital role in senescence and apoptosis, the two main tumor suppression mechanisms in human cells. 20th Asia Pacific Cancer Conference. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov 12-14, 2009.
12. Shah, N., Ishii, T. Kaul, S. and Wadhwa, R. (2009) Ashwagandha leaf extract and its components

induce differentiation in human glioblastomas. 20th Asia Pacific Cancer Conference. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov 12-14, 2009.

13. Gao, R., Ishii, T., Kaul, S. and Wadhwa, R. (2009) Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a potential target of metastasis. 20th Asia Pacific Cancer Conference. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov 12-14, 2009.
14. Priyandoko, D., Widodo, N., Ishii, T., Wadhwa, R. and Kaul, S. (2009) Use of Withanone as a protective reagent against the bio-toxicity of methoxyacetic acid (MAA). 20th Asia Pacific Cancer Conference. Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan, Nov 12-14, 2009.

4. 癌研究会、協和発酵キリン

論文

1. Nagasaki K, Miki Y : Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer.*, 13:2-7, 2006.
2. Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J, Ishii S. : Reduced Levels of ATF-2 Predispose Mice to Mammary Tumors. *Mol Cell Biol.*, 27:1730-1744, 2007.
3. Oishi Y, Nagasaki K, Miyata S, Matsuura M, Nishimura SI, Akiyama F, Iwai T, Miki Y. : Functional pathway characterized by gene expression analysis of supraclavicular lymph node metastasis-positive breast cancer. *J Hum Genet.*, 52::271-279, 2007.
4. Nagasaki K, Miki Y., Molecular prediction of the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer., *Breast Cancer.* 15(2):117-20, 2008
5. Komatsu A, Nagasaki K, Fujimori M, Amano J, Miki Y, Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer., *Int J Oncol.* 2008 Aug;33(2):261-70.
6. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T., SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells., *J Biol Chem.* 2008 Dec 1.
7. Yoshimura K, Takeuchi K, Nagasaki K, Ogishima S, Tanaka H, Iwase T, Akiyama F, Kuroda Y, Miki Y., Prognostic value of matrix Gla protein in breast cancer., *Molecular Medicine Reports.* 2009 2: 549-553.
8. Alper O, Stetler-Stevenson WG, Harris LN, Leitner WW, Ozdemirli M, Hartmann D, Raffeld M, Abu-Asab M, Byers S, Zhuang Z, Oldfield EH, Tong Y, Bergmann-Leitner E, Criss WE, Nagasaki K, Mok SC, Cramer DW, Karaveli FS, Goldbach-Mansky R, Leo P, Stromberg K, Weil RJ..Novel anti-filamin-A antibody detects a secreted variant of filamin-A in plasma from patients with breast carcinoma and high-grade astrocytoma., *Cancer Sci.* 2009 Jun 17.

総説、論文（査読無し）

9. 下地 尚、長崎光一、三木義男：乳腺の癌化機構、*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 13; 57-62, 2006.
10. 下地 尚、三木義男、長崎光一：薬剤感受性遺伝子群の同定、癌と化学療法、33;1-5, 2006.
11. 榎 慶子、長崎光一、三木義男：癌の遺伝子診断について、乳癌の臨床、21; 339-345, 2006.
12. 長崎光一、三木義男：遺伝子発現解析と乳癌の個別化医療、*Pharma Medica*、24; 47-51, 2006
13. 小松 哲、長崎光一、三木義男：新臨床腫瘍学、南光堂、東京、2006、70-74.
14. 長崎光一、小松 哲、三木義男：乳癌の遺伝子発現情報解析による抗癌剤効果予測診断への応用、*実験医学* 25;51-57,2007
15. 長崎光一、三木義男：がん薬物療法学 ―基礎・研究のアップデート― 癌分子診断のため

の手法、トランスクリプトーム解析 (cDNA マイクロアレイ、DNA チップ)、日本臨床 増刊号 148-155, 2009

16. 長崎光一、三木義男：遺伝子発現情報に基づいた乳癌薬物療法の有効性診断、医学のあゆみ 230(1); 89-93, 2009

学会発表、講演

1. Nagasaki K. : Molecular Prediction of the Therapeutic Response to Preoperative Paclitaxel and Docetaxel in Breast Cancer. 4th Breast Cancer Frontier Meeting、2006、Tokyo.
2. 長崎光一、星川 裕、下地 尚、吉本賢隆、霞 富士夫、秋山 太、坂元吾偉、宮田 敏、牛嶋 大、松浦正明、野田哲生、三木義男：「遺伝子発現プロファイルに基づく乳がん術前化学療法感受性予測システムの構築」、第 65 回日本癌学会学術総会 2007 年、横浜
3. 牛嶋 大、宮田 敏、長崎光一、三木義男、野田哲生、松浦正明：「OMICSS データを用いた治療効果予測の高精度化」、第 65 回日本癌学会学術総会 2007 年、横浜
4. 大石陽子、長崎光一、宮田 敏、松浦正明、西村誠一郎、岩瀬拓士、霞 富士夫、秋山 太、坂元吾偉、三木義男：「鎖骨上リンパ節転移陽性乳がんを特徴付ける機能ネットワークの解析」第 65 回日本癌学会学術総会 2007 年、横浜
5. Miki Y : Molecular prediction of therapeutic response to preoperative paclitaxel and docetaxel in breast cancer 第 65 回日本癌学会学術総会 (JCA-AACRJoint Symposium) 2007 年、横浜
6. 三木義男：「がんの遺伝学的個性診断」、「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」ワークショップ 2007 年、東京
7. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月：Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer., Koichi Nagasaki, Masaaki Matsuura, Tetsuo Noda, Yoshio Miki
8. 第 16 回日本乳癌学会学術総会、大阪、2008 年 9 月：乳癌診療 標準化から個別化へ 乳癌の化学療法感受性予測の試み. 三木義男、長崎光一、牛嶋大、松浦正明
9. 第 108 回日本外科学会定期学術集会、長崎、2008 年 5 月：乳がん術前化学療法の効果予測システム開発の試み(Molecular prediction of the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer). 三木義男
10. 第 108 回日本外科学会定期学術集会、長崎、2008 年 5 月：鎖骨上リンパ節転移陽性乳がんの機能ネットワーク解析. 大石陽子、松永浩子、川村徹、佐藤康、中嶋昭、三木義男、三浦妙太
11. 第 108 回日本外科学会定期学術集会、長崎、2008 年 5 月：乳癌における新規欠失遺伝子多型の同定. 小松哲、長崎光一、藤森実、天野純、三木義男
12. 第 16 回日本乳癌学会学術総会、大阪、2008 年 9 月：Stathmin 1 染色を用いた予後予測と抗がん剤感受性予測の検討. 大石陽子、松永浩子、川村徹、佐藤康、中嶋昭、三木義男、三浦妙太
13. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月：トランスフェクションアレイを用いた薬剤感受性遺伝子機能ネットワーク解析システムの構築(Development of high-throughput functional screening system for chemo-sensitivity related genes using transfection array). 長崎光一、星川裕、下地尚、牛嶋大、松浦正明、野田哲生、三木義男
14. 第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008 年 10 月：乳癌における新規欠失遺伝子多型の同定(Identification of novel deletion copy number variations in Breast cancer). 小松哲、長崎光一、藤森実、伊藤研一、三木義男
15. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月：トランスフェクションアレイを用いた薬剤感受性遺伝子の機能ネットワーク解析、長崎光一、下地尚、牛嶋大、松浦正明、野田哲生、三木義男
16. 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月：乳がんの抗がん剤治療効果予測法の開発、

三木義男、長崎光一、牛嶋大、宮田敏、松浦正明、野田哲生

17. 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009 年 10 月: 遺伝子診断による個別化乳癌術前化学療法、伊藤良則、三木義男、秋山太、松浦正明、長崎光一、岩瀬拓士、畠清彦

(国際学会)

18. Second JCA-AACR Special Joint Conference (淡路島) July, 2008: Molecular prediction of the therapeutic response to preoperative paclitaxel and docetaxel in breast cancer., Yoshio Miki
19. 14th Samsung International Symposium on Molecular Medicine (SISMM) (韓国・ソウル) September, 2008: Molecular prediction of the therapeutic response to preoperative chemotherapy with paclitaxel in breast cancer, Koichi Nagasaki
20. Ehrlich II - 2nd World Conference on Magic Bullets (ドイツ・ニュルンベルグ) October, 2008: Molecular prediction of the therapeutic response to preoperative chemotherapy with paclitaxel in breast cancer, Nagasaki K, Shimoji T, Matsuura M, Noda T, Miki K
21. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association (アメリカ・ハワイ) February, 2010: Development of high-throughput functional screening system for chemo-sensitivity related genes using transfection cell array, Nagasaki K, Shimoji T, Ito Y, Iwase T, Akiyama F, Matsuura M, Noda T, Miki Y
22. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association (アメリカ・ハワイ) February, 2010: Molecular analysis for the differential diagnosis of the cartilaginous tumors, Shimoji T, Nagasaki K, Isomura M, Miki Y, Noda T

5. カネボウ化粧品

総説、論文 (査読無し)

1. バイオインフォマティクスの化粧品科学への応用—マイクロアレイと文献を活用した新規 DNA 修復関連遺伝子の探索—、杉山義宣、青 裕子、Fragrance J. 35(1), 37-39, 2007
2. 化粧品開発でのバイオサイエンスの応用、井上紳太郎、化学と生物 46, 265-273, 2008

学会発表

1. 2008.5 月; 国際色素細胞学会・国際メラノーマ学会合同大会; High-throughput screening for gene function related to UV response using siRNA-transfected cell arrays; 杉山義宣
2. 2008.5 月; 国際研究皮膚科学会; High-throughput screening for gene function related to UV response using reverse transfection of siRNAs from solid surface; 吉田浩之、山崎恒平、遠藤洋子、高橋慶人、藤田聡史、三宅淳、森脇真一、杉山義宣
3. 2008.5 月; Cellular Responses to DNA Damage 2008 conference., Evaluation of the function of double-strand DNA break repair genes in cellular UV response using reverse transfection of siRNAs from a solid surface. 高橋慶人、吉田浩之、山崎恒平、遠藤洋子、藤田聡史、三宅淳、森脇真一、杉山義宣
4. 2008.10 月; 25th IFSCC CONGRESS 2008 (国際化粧品技術者大会); Functional screening for genes related to cellular UV sensitivity using RNAi-based cell arrays. 吉田浩之、山崎恒平、遠藤洋子、高橋慶人、藤田聡史、三宅淳、杉山義宣
5. 2009.3 月; ASCS2009 第 9 回アジア化粧品技術者会; Functional Screening for Genes Involved in UV Response Using siRNA-transfected Cell Arrays. 吉田浩之、山崎恒平、遠藤洋子、近藤雅俊、高橋慶人、藤田聡史、三宅淳、杉山義宣
6. 2009.3 月; 太陽紫外線防御研究委員会第 19 回シンポジウム; トランスフェクションアレイに

よる紫外線感受性遺伝子の探索、高橋慶人

7. 2009.7 月 ; 日本動物細胞工学会 2009 年度大会シンポジウム、スキンケア研究でのヒト皮膚細胞培養技術の重要性、井上紳太郎

その他の公表 (プレス発表等)

1. 日経産業新聞 (2007.5.29) 掲載、「産総研とカネボウ/紫外線が壊した細胞修復遺伝子群を発見」
2. 化粧品業界紙「Cosmetic Design」282 号 (2007.6.5 号)、「UV ケアターゲット遺伝子を解明へ」: 産総研とカネボウ化粧品が NEDO プロジェクト「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」を実施

6. 東京大学 (三宅研)

論文

1. Kazumi Hakamada, Satoshi Fujita, and Jun Miyake: “Onset timing of transient gene expression depends on cell division, *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 62-66 (2010).
2. Onuki-Nagasaki R, Nagasaki A, Hakamada K, Uyeda TQ, Fujita S, Miyake M, Miyake J. , Transfection microarrays for high-throughput phenotypic screening of genes involved in cell migration, *Methods Mol Biol.* 629:193-203 (2010).
3. Fujita S, Takano K, Ota E, Sano T, Yoshikawa T, Miyake M, Miyake J., New methods for reverse transfection with siRNA from a solid surface. *Methods Mol Biol.* 623:197-209 (2010).
4. Yasuhito Tokumoto, Shinichiro Ogawa, Teruyuki Nagamune, and Jun Miyake: A comparison of efficiency of terminal differentiation of oligodendrocytes from induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells in vitro, *J. Biosci. Bioeng.*, 107, electric published online on 14 Dec. (2009).
5. Atsuko Hasegawa, Chikako Yamada, Miho Tani, Shun-ichiro Hirano, Yasuhito M. Tokumoto, and Jun Miyake: Caspase inhibitors increase the rate of recovery of neural stem/progenitor cells from post-mortem rat brains stored at room temperature, *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 652-657 (2009).
6. Yasuhito Tokumoto, Katsuhisa Horimoto, and Jun Miyake: TRAIL inhibited the cyclic AMP responsible element mediated gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 533-536 (2009).
7. Miyake M, Yoshikawa T, Fujita S, Miyake J: Transfection microarray and the applications, *Molecular Biosystems*, 5(5), 444-449 (2009).
8. Yamada S, Hakamada K, Munekata T, Takano K, Fujita S, Miyake M, Miyake J.: The system for analyzing the event timing profile of each single-cell by using the model of neurite maturation of PC12D cells, *Biosens Bioelectron* 24(5), 1493-1497 (2009)
9. Fujita, S., Takano, K., Ota, E., Yoshikawa, T., Sasaki, C., Sano, T., Miyake, M.*, Miyake, J. High throughput screening with siRNA; RNA Interference: From Biology to Clinical Application. *Method in Mol Biol.*, Min, W-P. eds. Humana Press, In press.
10. Uchimura, E., Yamada, S., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. Reverse Transfection Using Gold Nanoparticles; Micro and nano technologies in bioanalysis; *Methods and protocols. Method in Mol Biol.*, Lee, J. W. and Foote, R. S. eds. Humana Press, 544, 609-616 (2009).
11. T. Sugitate, T. Kihara, X.Y. Liu, J. Miyake, Mechanical role of the nucleus in a cell in terms of elastic modulus, *Current Applied Physics* 4S1, e291-e293 (2009).
12. Yamada S, Fujita S, Uchimura E, Miyake M, Miyake J., Reverse transfection using gold nanoparticles, *J. Methods Mol. Biol.* 544, 609-616 (2009).
13. Miyake M, Yoshikawa T, Fujita S, Miyake J., Transfection microarray and the applications, *J. Mol.*

- Biosyst. 5, 444-449 (2009).
14. Onuki-Nagasaki, R.1, Nagasaki, A.1, Hakamada, K., Uyeda, Q., P., T., Fujita, S.*, Miyake, M., Miyake, J. On-chip screening method for cell-migration genes based on a transfection microarray. *Lab Chip*, 8, 1502-1506 (2008).
 15. Yamada, S., Nomura, T., Takano, K., Fujita, S., Miyake, M*, Miyake, J. Expression of a chimeric CSF1R-LTK mediates ligand-dependent neurite outgrowth. *Neuroreport.*, 19, 1733-1738 (2008).
 16. Yamada S, Nomura T, Takano K, Fujita S, Miyake M, Miyake J, Expression of a chimeric CSF1R-LTK mediates ligand-dependent neurite outgrowth, *Neuroreport* 19, 1733-1738 (2008).
 17. Masayuki Hara, Yumiko Yamano, Yoshitsugu Sakai, Eri Kodama, Takayuki Hoshino, Masayoshi Ito, Jun Miyake, Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: Zeaxanthin, zeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin, *Materials Sci. Eng. C* 28, 274-279 (2008).
 18. Uchimura, E., Yamada, S., Fujita, S., Miyake, M., Miyake, J., Reverse Transfection Using Gold Colloid; Microfluids, Nanotechnologies, and Physical Chemistry (Science) in Separation, Detection, and Analysis of Biomolecules (ed. Lee, J. W.), *Method in Mol Biol.*, Humana Press, in press (2008).
 19. Fujita, S., Ota, E., Sasaki, C., Takano, K., Miyake, M., Miyake, J., Highly Efficient Reverse Transfection with siRNA in Multiple Wells of Microtiter Plates; RNA Interference: From Biology to Clinical Application (ed. Min, W-P.), *Method in Mol Biol.*, Humana Press, in press (2008).
 20. 三宅 淳, 再生医療の経済的影響, *日本臨床* 66, 1004-1012 (2008).
 21. Yamada, S., Uchimura, E., Ueda, T., Nomura, T., Fujita, S., Matsumoto, K., Funeriu, D. P., Miyake, M*, Miyake, J. Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 926-930 (2007).
 22. Fujita, S., Ota, E., Sasaki, C., Takano, K., Miyake, M.*, Miyake, J. Highly efficient reverse transfection with siRNA in multiple wells of microtiter plates. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 329-333 (2007).
 23. Uchimura, E., Yamada, S., Nomura, T., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. Reverse transfection using antibodies against cell surface antigen in mammalian adherent cell lines. *J. Biosci. Bioeng.*, 104, 152-155 (2007).
 24. Yamada, S., Nomura, T., Uebersax, L., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. Retinoic acid induces functional c-Ret tyrosine kinase in human neuroblastoma. *Neuroreport*, 18, 359-363 (2007).
 25. Uchimura, E., Yamada, S., Uebersax, L., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. A Method for Reverse Transfection Using Gold Colloid as a Nano-Scaffold. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 101-103 (2007).
 26. Kato T., Kanemura Y., Shiraishi K., Miyake J., Kodama S., Hara M., Early response of neural stem/progenitor cells after X-ray irradiation in vitro, *Neuroreport* 11, 895-900 (2007).
 27. Uchimura E., Yamada S., Uebersax L., Fujita S., Miyake M., Miyake J., Method for reverse transfection using gold colloid as a nano-scaffold, *J. Biosci Bioeng.* 103, 101-103 (2007).
 28. Fujita S, Ota E, Sasaki C, Takano K, Miyake M, Miyake J., Highly efficient reverse transfection with siRNA in multiple wells of microtiter plates, *J. Biosci Bioeng.* 104, 329-333 (2007).
 29. Yamada, S., Nomura, T., Uebersax, L., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M., Miyake, J., Retinoic acid induces functional c-Ret tyrosine kinase in human neuroblastoma, *NeuroReport* 18, 359-363 (2007).
 30. Uchimura E, Yamada S, Nomura T, Matsumoto K, Fujita S, Miyake M, Miyake J, Reverse transfection using antibodies against a cell surface antigen in mammalian adherent cell lines, *J. Biosci Bioeng.* 104, 152-155 (2007).
 31. Yamada S, Uchimura E, Ueda T, Nomura T, Fujita S, Matsumoto K, Funeriu DP, Miyake M, Miyake J, Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen, *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun. 363, 926-930 (2007).
32. Nakamura C, Miyamoto C, Obataya I, Takeda S, Yabuta M, Miyake J, Enzymatic nanolithography of FRET peptide layer using V8 protease-immobilized AFM probe, Biosens. Bioelectron.. 22, 2308-2314 (2007).
 33. 三宅正人, 吉川智啓, 内村英一郎, 藤田聡史, 三宅 淳, 第15回化学・バイオつくば賞受賞研究「トランスフェクションマイクロアレイと遺伝子ネットワーク解析技術への応用」, 化学・バイオつくば財団ニュース 63, 5-7 (2007).
 34. 三宅 淳, 藤田聡史, 三宅正人, トランスフェクションマイクロアレイと遺伝子ネットワーク解析技術, 月刊機能材料 27, 45-52 (2007).
 35. Yamada, S., Uchimura, E., Ueda, T., Iguchi, F., Akiyama, Y., Fujita, S., Miyake, M.*, Miyake, J. Area based Analyzing Technique at Cell Array Experiment using Neuronal Cell Line. NanoBiotech., 2, 95-100 (2006).
 36. Fujita, S., Yamada, S., Hakamada, K., Miyake, M., Miyake, J. Development of Transfection Microarray and its Application. Proceeding of UT Symposium on Nanobio Integration, 1, 297-298 (2006).
 37. Shigeru Yamada, Eiichiro Uchimura, Takanori Ueda, Fukumi Iguchi, Yutaka Akiyama, Satoshi Fujita, Masato Miyake, Jun Miyake, Area-Based Analyzing Technique at Cell Array Experiment Using Neuronal Cell Line, NanoBiotechnology 2, 95-100 (2006).
 38. 三宅 淳, 再生医療の社会的展望—産業化へ向けて, 新医療 2, 122-124 (2006).
 39. 三宅 淳, 再生医療の発展基盤を求めて, 材料の科学と工学 43, 149 (2006).
 40. 中村 史, 小幡谷育夫, 韓 成雄, 三宅 淳, 細胞への針挿入の力学挙動, 日本物理学会会誌 61, 356-360 (2006).

特許 (出願人は産業技術総合研究所)

1. 名称: 細胞運動性評価セルチップ、出願番号: 特願 2007-144215、出願日: 2007.5.30、公開番号: 特開 2008-295351、公開日: 2009.12.11、PCT 番号: WO2008/149809、PCT 出願日: 2008.12.11、出願人: 産業技術総合研究所、発明者: 藤田聡史(30)/長崎晃(30)/三宅淳(20)/長崎玲子(15)/三宅正人(5)

学会発表 (国際学会)

1. Yasuhito Tokumoto, Katsuhisa Horimoto, and Jun Miyake: "An identification of activated MAPK pathway in a living cell", APBioChEC2009 (2009.11, Kobe, Japan)
2. Shinichiro Ogawa, Yasuhito Tokumoto, Jun Miyake, and Teruyuki Nagamune: "The generation of oligodendrocyte from induced pluripotent stem cell", APBioChEC2009 (2009.11, Kobe, Japan)
3. Kazumi Hakamada, and Jun Miyake: "Single cell time course analysis revealed the cell division dependence of gene transfer", APBioChEC2009 (2009. 11, Kobe, Japan)
4. Kazumi Hakamada, and Jun Miyake: "Cell division is the key of the onset timing of the transfected gene expression", CBI-KSBSB Joint Conference 2009, (2009. 11, Busan, Korea)
5. Yasuhito Tokumoto, Jun Miyake: "Measurement of transcription cis-element reporter activity by living cell imaging", Trilateral Symposium on Systems and Synthetic Biology 2009 (2009.8, Suwon, Korea)
6. Kazumi Hakamada, Satoshi Fujita, and Jun Miyake: Unveiled cellular dynamics by single cell time-course analysis", EMBO conference, Heidelberg, Germany (2008)
7. Katsuhisa Horimoto, Hiroshi Yoshida, Daisuke Tominaga, Sachiyo Aburatani, Fuyan Sun, Yutaka Akiyama, Yasuhito Tokumoto, Jun Miyake: "Dynamical analysis of biological networks by using reporter gene expression in transfected cell microarray", DMHF2007: COE Conference on the

Development of Dynamic Mathematics with High Functionality (2007.10.17, Fukuoka, Japan)

(国内学会)

2009

8. 小川真一郎, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: “マウス iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導の試み”, 第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 横浜 (2009)
9. 小川真一郎, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: “iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
10. 徳元康人, 堀本勝久, 三宅淳: “生細胞内で活性化されている MAPK の同定”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
11. 藤田聡史, 高野幸太, 樋田智都子, 袴田和巳, 三宅正人, 三宅淳: “一細胞時系列計測による TRAIL 耐性 HeLa 細胞の感受化に関わる siRNA の評価”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
12. 長崎玲子, 栗城直美, 袴田和巳, 長崎晃, 藤田聡史, 三宅正人, 三宅淳: “細胞運動性評価チップを用いた細胞運動に関わるキヌーム解析”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
13. 三宅正人, 関口さくら, 藤田聡史, 袴田和巳, 三宅淳: “培養条件の詳細制御による大規模遺伝子スクリーニング系の検討”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
14. 袴田和巳, 三宅淳: “一細胞時系列解析による遺伝子発現メカニズムの検討”, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋大学, 名古屋 (2009)
15. 小川真一郎, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: “iPS 細胞からのオリゴデンドロサイト分化誘導”, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋国際会議場, 名古屋 (2009)
16. 徳元康人, 堀本勝久, 三宅淳: “生細胞において活性化される MAP キナーゼ経路の同定”, 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋国際会議場, 名古屋 (2009)
17. 富永大介, 徳元康人, 孫富艶, 中津井雅彦, 中川康二, 堀本勝久, 三宅淳: “生細胞内で活性化しているパスウェイの時系列データに基づいた同定法”, 第 4 回産業用酵素シンポジウム/FS フォーラム「蛋白質化学と産業応用の新しい関係」, 東京大学, 東京 (2009)
18. 三宅淳: “ゲノム創薬の新技术の可能性-システムバイオロジー、GIGA シークエンサー、細胞アレイ等を巡る状況-”, ゲノム創薬フォーラム談話会, 薬学会館, 東京 (2009)

2008

19. 徳元康人, 三宅淳, 富永大介, 堀本勝久: “生細胞内で活性化されている MAPK の同定”, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド, 神戸 (2008)
20. 藤田聡史, 長崎玲子, 山田茂, 三宅正人, 三宅淳: “固相トランスフェクション技術を用いた細胞表現型解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド, 神戸 (2008)
21. 大貫(長崎)玲子, 栗城直美, 袴田和巳, 長崎晃, 藤田聡史, 三宅正人, 三宅淳: “細胞チップを用いた細胞運動関連遺伝子群の網羅的解析”, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド, 神戸 (2008)
22. 袴田和巳, 藤田聡史, 三宅淳: “一細胞時系列解析を用いた細胞ダイナミクス解析手法の開発”, 第 46 回日本生物物理学会, 福岡国際会議場, 福岡 (2008)
23. 徳元康人, 富永大介, 油谷幸代, 孫富艶, 中津井雅彦, 山口哲志, 堀本勝久, 長棟輝行, 三宅淳: “Development of a new technology for genome network analysis by multi time-laps imaging of living cells”, 第 60 回日本生物工学会大会, 東北学院大学, 仙台 (2008)

24. 藤田聡史, 山田茂, 長崎玲子, 袴田和巳, 三宅正人, 三宅淳: “固相トランスフェクション法を用いた細胞内分子ネットワーク解析”, 第 60 回日本生物工学会大会, 東北学院大学, 仙台 (2008)
25. 袴田和巳, 藤田聡史, 三宅正人, 三宅淳: “一細胞時系列解析による細胞の動的挙動の解析”, 第 60 回日本生物工学会大会, 東北学院大学, 仙台 (2008)
26. 袴田和巳, 藤田聡史, 三宅正人, 三宅淳: “一細胞時系列解析を用いた遺伝子導入メカニズム”, 第 8 回遺伝子デリバリー研究会, メープル有馬, 兵庫 (2008)
27. 徳元康人, 小川真一郎, 長棟輝行, 三宅淳: “A DNA Chip analysis of a biological timer in the oligodendrocyte development”, 第 41 回日本発生生物学会大会, Tokushima Arts Foundation For Culture, 徳島 (2008)
28. 徳元康人, 富永大介, 油谷幸代, 孫富艶, 袴田和巳, 山口哲志, 堀本勝久, 長棟輝行, 三宅淳: “ゲノムネットワークの解析技術に関する基盤技術の整備”, 日本化学会第 88 回春季年会, 立教大学, 東京 (2008)
29. 袴田和巳, 藤田聡史, 三宅淳: “一細胞時系列解析を用いた細胞状態の把握”, 日本化学会第 88 回春季年会, 立教大学, 東京 (2008)

2007

30. 袴田和巳, 藤田聡史, 三宅淳: “一細胞時系列を用いた *in silico* 細胞周期同調法の開発”, 第 45 回日本生物物理学会, パシフィコ横浜, 横浜 (2007)
31. 徳元康人, 長棟輝行, 三宅淳: “オリゴデンドロサイト前駆細胞の甲状腺ホルモン感受性に関わる遺伝子の探索”, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜, 横浜 (2007)
32. 藤田聡史, 袴田和巳, 山田茂, 長崎玲子, 三宅正人, 三宅淳: “固相トランスフェクション法を用いた遺伝子機能解析ツールの開発と応用”, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜, 横浜 (2007)
33. 大貫(長崎)玲子, 長崎晃, 藤田聡史, 袴田和巳, 三宅正人, 三宅淳: “トランスフェクションアレイ技術を用いた細胞運動性評価チップの開発”, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, パシフィコ横浜, 横浜 (2007)
34. 山口哲志, 大越優樹, 築地真也, 袴田和巳, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: “ケージド DNA を用いた遺伝子発現制御型セルアレイの開発”, 第 59 回日本生物工学会大会, 広島大学, 広島 (2007)
35. 袴田和巳, 木原隆典, 徳元康人, 藤田聡史, 長棟輝行, 三宅淳: “細胞状態規定のための一細胞時系列解析”, 第 59 回日本生物工学会大会, 広島大学, 広島 (2007)
36. 徳元康人, 袴田和巳, 木原隆典, 長棟輝行, 三宅淳: “オリゴデンドロサイト前駆細胞の *in vitro* 分化像の時系列的解析”, 第 59 回日本生物工学会大会, 広島大学, 広島 (2007)
37. 山口哲志, 大越優樹, 袴田和巳, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: “ケージド核酸を用いた高効率な遺伝子発現制御”, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007, 東京大学, 東京 (2007)
38. 徳元康人, 長棟輝行, 三宅淳: “オリゴデンドロサイト前駆細胞の *in vitro* 分化像の時系列解析”, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007, 東京大学, 東京 (2007)
39. 徳元康人: 「マルチスキヤン生細胞自動観察装置 (EVE) によるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (O-2A cell) の分化過程の観察」平成 19 年度第一回化学生命工学専攻談話会 (2007.6.28, 東京)
40. 徳元康人, 三宅淳: “A time-laps imaging of *in vitro* differentiation of oligodendrocyte/type-2 astrocyte precursor (O-2A) cell”, 第 40 回日本発生生物学会/第 59 回細胞生物学会合同大会, 福

岡国際会議場, 福岡 (2007)

41. 木原隆典, 徳元康人, 袴田和巳, 中川貴司, 藤田聡史, 中村史, 三宅正人, 三宅淳: “セルインフォマティクスとナノテクノロジーを用いた細胞機能解析”, 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 東京大学, 東京 (2006)

受賞

1. トランスフェクションアレイシステムの開発、2007年、(第15回)「化学・バイオつくば賞」受賞、三宅正人、吉川智啓、内村 英一郎、藤田聡史、三宅淳

7. 東京大学 (長棟研、鷺津研)

(癌細胞浸潤性評価システムの構築)

論文

1. 山口哲志, 新海政重, 加藤耕一, 長棟輝行: "第10章 医薬品スクリーニング用細胞アレイのための細胞固定化および細胞転写技術", バイオ医薬の開発技術とシーズ (山本重夫 監修), CMC 出版, pp.90-99 (2009)
2. 長棟輝行, 高野等覚, 竹澤俊明, 新海政重: "細胞転写技術を用いた細胞アレイ作製技術", 遺伝子医学 MOOK 別冊, 進みつつける細胞移植治療の実際、上巻 (田畑泰彦 編集), (株) メディカルドゥ, pp.230-234 (2008)
3. 加藤耕一, 長棟輝行: "細胞マイクロアレイ", マイクロアレイ・バイオチップの最新技術 (伊藤嘉浩 監修), CMC 出版, p.273-284 (2007)
4. 長棟輝行: "細胞膜修飾剤 (BAM) を用いた浮遊性細胞のパターニングとその応用", 動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス (酒井康行, 民谷栄一 監修), CMC 出版, p.92-103 (2007)
5. 加藤耕一, 長棟輝行: "非接着細胞マイクロアレイ作製技術", バイオインダストリー, 23,12-22 (2006)
6. 新海政重, 山脇健吾, 長棟輝行: "Origami を使った細胞の三次元パターニング", 化学工学シンポジウムシリーズ 79-診断・治療システムにおける化学工学, 化学工学会, p.58-62 (2005)

学会発表

1. 松沼絵里香, 新海政重, 山口哲志, 木原隆典, 三宅淳, 長棟輝行: "細胞転写・積層技術の癌細胞浸潤性 TFA チップへの応用", シンポジウム「医薬品探索・開発のための細胞アッセイ技術」, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京 (2009)
2. 松沼絵里香, 山口哲志, 新海政重, 木原隆典, 徳元康人, 三宅淳, 長棟輝行: "細胞転写技術の癌細胞浸潤性評価 TFA チップへの応用", 第24回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム, 九州大学, 福岡 (2009)
3. 高野 等覚, 新海 政重, 竹澤 俊明, 長棟 輝行: "細胞転写技術を用いた表皮類似構造構築", 化学工学会第73年会, 静岡大学浜松キャンパス, 浜松 (2008)
4. 松沼絵里香, 新海政重, 山口哲志, 木原隆典, 袴田和巳, 大島浩明, 三宅淳, 長棟輝行: "細胞転写・積層技術の癌細胞浸潤性評価 TFA チップへの応用", 化学工学会第40回秋季大会, 東北大学, 仙台 (2008)
5. T. Nagamune: "Cell-based Biodevices for High-throughput Cell Functional Analysis", BIOTronics 2008, International Conference on Biosensors, Biochips, and Bioelectronic Devices, Jeju, Korea (2008)
6. 高野等覚, 新海政重, 工藤菜々子, 米山知佳子, 竹澤俊明, 長棟輝行: "細胞転写技術を用いた細胞外マトリクスゲルシート上への細胞の2D、3D パターニング", 第59回日本生物工学会, 広島大学東広島キャンパス, 広島 (2007)

7. T. Takano, M. Shinkai, T. Takezawa, T. Nagamune: "Studies of cell transfer printing for construction cell array", The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Waseda University, Tokyo, Japan (2007)
8. 高野等覚, 新海政重, 工藤菜々子, 米山知佳子, 竹澤俊明, 長棟輝行: "細胞転写技術を用いた新規細胞パターンニング技術の開発", 第 58 回生物工学会, 大阪大学豊中キャンパス (2006)
9. M. Shinkai, K. Yamawaki, L. Wang and T. Nagamune: "Origami - the Retrosynthesis of Organ", 2006 AIChE Annual Meeting, San Francisco, USA (2006)
10. M. Shinkai, T. Takano, T. Takezawa and T. Nagamune: "Transfer Printing of Cells Using Biocompatible Anchor for Membrane", NANOBIO-TOKYO 2006, Tokyo, Japan (2006)

(浮遊系細胞用 TFA 技術の研究開発)

論文

1. Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Tomohisa Kato, Junya Toguchida and Masao Washizu: "Massively parallel on-chip Electroporation device Designed for long term post-culturing", μ -TAS 2009, p.570-572 (2009)
2. Masao Washizu and Boonchai Techaumnat: "Polarization and Membrane Voltage of Ellipsoidal Particle with a Constant Membrane Thickness – a Series Expansion Approach", IET Nanobiotechnology, Vol. 2, No. 3, p.62–71 (2008)
3. Boonchai Techaumnat and Masao Washizu: "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells", J. Phys. D: Appl. Phys. 40 1831–1837 (2007)

学会発表

1. 福島一幸, 山口哲志, 黒澤 修, 鷺津正夫, 長棟輝行: "固定化した浮遊性細胞への電界集中型エレクトロポレーションによる高効率な遺伝子導入法の開発", 化学工学会第 74 年会, 横浜国立大学, 横浜 (2009)
2. 福島 一幸, 黒澤 修, 鷺津 正夫, 長棟輝行: "電界集中型エレクトロポレーションを用いた浮遊性細胞への生体高分子の高効率な導入法の開発", 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 東京工業大学, 横浜 (2009)
3. Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Tomohisa Kato, Junya Toguchida and Masao Washizu: "Massively parallel on-chip Electroporation device Designed for long term post-culturing", μ -TAS 2009, p.570-572 (2009)
4. H. Kotake, K. Terao, A. Okonogi, R. Yokokawa, M. Gel, M. Washizu and H. Kotera: "Three-dimensional electroporation chip for realtime monitoring of intracellular dynamics", μ -TAS 2009, p.1159-1161 (2009)
5. Masao Washizu: "Bionanotechnology for the measurement, modification and utilization of cellular functions", MIPE 2009, p.321-324 (Keynote Address) (2009)
6. 黒澤修・小穴英廣・小寺秀俊・鷺津正夫: 「電気泳動効果を利用したオンチップエレクトロトランスフェクション」化学とマイクロ・ナノシステム研究会 CS-06 p.40 (2008)
7. Masao Washizu: "Bio-Manipulation based on Microfabricated Structures" SSDM2008, D-9-1 (Invited) pp. 944-945 (2008)
8. 倉澤知隆・黒澤修・鷺津正夫: 「マイクロチップを用いた細胞応答計測の研究」化学とマイクロ・ナノシステム研究会, FP13, p.16 (2008)
9. 黒澤修・小穴英廣・小寺秀俊・鷺津正夫: 「電界集中を利用したオンチップエレクトロトランスフェクション 遺伝子導入のためのパルス条件の検討」化学とマイクロ・ナノシステム研究会, SP01, p.60 (2008)

10. 黒澤修・小穴英廣・小寺秀俊・鷺津正夫：「電界集中を利用したオンチップエレクトロポレーション：エレクトロポレーション後の細胞の生存性に関する検討」化学とマイクロ・ナノシステム研究会 p.35(2007)
11. 福島一幸, 駱煥東, 黒澤修, 鷺津正夫, 長棟輝行: "電界集中型エレクトロポレーション法を用いた生体高分子の高効率な細胞内導入法の開発", 第 59 回日本生物工学会, 広島大学, 広島 (2007)

(遺伝子発現の同期化技術の開発)

論文

1. S. Yamaguchi, Y. Chen, S. Nakajima, T. Furuta, and T. Nagamune: "Light-Activated Gene Expression from Site-Specific Caged DNA with a Biotinylated Photolabile Protection Group", Chem. Commun. in press.
2. S. Hashiro, S. Tsukiji, and T. Nagamune: "Rapid and efficient induction of an endogenous cell signaling event by subcellular targeting of a synthetic ligand", J. Am. Chem. Soc. 131, 13569-13569 (2009)
3. K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, and T. Nagamune: "A bromocoumarin-based linker for synthesis of photocleavable peptidoconjugates with high photosensitivity", Chem. Commun., 5399-5401 (2008)
4. T. Kawakami, H. Cheng, S. Hashiro, Y. Nomura, S. Tsukiji, T. Furuta, and T. Nagamune: "A caged phosphopeptide-based approach for photochemical activation of kinase in living cells", ChemBioChem, 9, 1583-1586 (2008)
5. 築地真也、菅裕明、長棟輝行: "細胞内情報をあやつる", Bionics, 16, 46-51 (2006)

学会発表

1. S. Yamaguchi, S. Nakajima, Y. Chen and T. Nagamune: "Control of gene expression using caged plasmids with functionalized photo-cleavable linkers", APBioChEC2009, Kobe, Japan (2009)
2. 山口 哲志、中島 聡、長棟 輝行: "部位特異的ケージドプラスミドを用いた遺伝子発現の光制御", 化学工学会第 41 回秋季大会, 広島大学, 東広島 (2009)
3. 山口 哲志、中島 聡、古田寿昭、長棟 輝行: "部位特異的ケージド DNA を用いた遺伝子発現の光活性化", 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 九州大学, 福岡 (2009)
4. 陳燕杰, 山口哲志, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "プラスミドの部位特異的ケージングによる遺伝子発現制御", 日本化学会第 89 春季年会, 日本大学, 船橋 (2009)
5. 大越優樹, 山口哲志, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "機能性分子修飾を可能とする光分解性リンカーを用いたケージド核酸の開発", 日本化学会第 89 春季年会, 日本大学, 船橋 (2009)
6. 羽城周平, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "合成ペプチドの細胞膜アンカリングによるチロシンキナーゼシグナリングの制御", 日本化学会第 88 春季年会, 立教大学, 東京 (2008)
7. 羽城 周平, 小熊 友一, 築地 真也, 津本 浩平, 古田 寿昭, 長棟 輝行: "チロシンキナーゼシグナリングの光制御を目指したケージドホスホチロシンペプチド", 日本化学会第 87 春季年会, 関西大学, 大阪 (2007)
8. 片山健太郎, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "ペプチド型分子ツールの創製のための新規ケージドリンカー", 日本化学会第 87 春季年会, 関西大学, 大阪 (2007)
9. T. Oguma, S. Tsukiji, T. Kawakami, H. Cheng, Y. Nomura, T. Furuta and T. Nagamune: "Caged phosphotyrosine peptides: New chemical tool for controlling cell signaling pathways by light", NANOBIO-TOKYO 2006, Tokyo, Japan (2006)
10. 片山健太郎, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "光スプリッティングペプチドの合成とその応用", 第 21 回生体機能関連化学シンポジウム, 京都大学, 京都 (2006)
11. 小熊友一, 築地真也, 古田寿昭, 長棟輝行: "改良型ケージドホスホチロシンペプチドの合成と

SH2 ドメインとの相互作用解析", 第 21 回生体機能関連化学シンポジウム, 京都大学, 京都 (2006)

8. 京都大学

論文

1. Dukka Bahadur K.C., E. Tomita, J. Suzuki, K. Horimoto and T. Akutsu, Protein threading with profiles and distance constraints using clique based algorithms, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 4, 19-42, 2006.
2. J.C. Nacher, J-M. Schwartz, M. Kanehisa and T. Akutsu, Identification of metabolic units induced by environmental signals, *Bioinformatics*, 22, e375-e383, 2006.
3. S-Q. Zhang, W-K. Ching, M.K. Ng and T. Akutsu, Simulation study in Probabilistic Boolean Network models for genetic regulatory networks, *International Journal of Data Mining and Bioinformatics*, 1, 217-240, 2007.
4. S-Q. Zhang, M. Hayashida, T. Akutsu, W-K. Ching and M. K. Ng, Algorithms for finding small attractors in Boolean networks, *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 2007, 20180 (13 pages), 2007.
5. T. Akutsu, M. Hayashida, W-K. Ching and M.K. Ng, Control of Boolean networks: Hardness results and algorithms for tree structured networks, *Journal of Theoretical Biology*, 244, 670-679, 2007.
6. W-K. Ching, S-Q. Zhang, M.K. Ng and T. Akutsu, An approximation method for solving the steady-state probability distribution of probabilistic Boolean networks, *Bioinformatics*, 23, 1511-1518, 2007.
7. M. Hayashida, T. Tamura, T. Akutsu, S-Q. Zhang and W-K. Ching, Algorithms and complexity analyses for control of singleton attractors in Boolean networks, *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 2008, 521407 (16pages), 2008.
8. T. Akutsu, M. Hayashida, S-Q. Zhang, W-K. Ching and M. K. Ng, Analyses and algorithms for predecessor and control problems for Boolean networks of bounded indegree, *IPSI Transactions on Bioinformatics*, 1, 23-34, 2008.
9. M. Hayashida, F. Sun, S. Aburatani, K. Horimoto and T. Akutsu, Integer programming-based approach to allocation of reporter genes for cell array analysis, *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*, 4, 385-399, 2008.
10. W-K. Ching, S-Q. Zhang, Y. Jiao, T. Akutsu, N.-K. Tsing and A.S. Wong, Optimal control policy for probabilistic Boolean networks with hard constraints, *IET Systems Biology*, 3, 90-99, 2009.
11. T. Tamura and T. Akutsu, Algorithms for singleton attractor detection in planar and nonplanar AND/OR Boolean networks, *Mathematics in Computer Science*, 2, 401-420, 2009.
12. T. Akutsu and T. Tamura, On finding a fixed point in a Boolean network with maximum indegree 2, *IEICE Transactions on Fundamentals of Electronics, Communications and Computer Sciences*, E92-A, 1771-1778, 2009.
13. M. Hayashida, T. Tamura, T. Akutsu, W-K. Ching and Y. Cong, On distribution and enumeration of attractors in probabilistic Boolean networks, *IET Systems Biology*, 3, 465-474, 2009.
14. T. Akutsu, T. Tamura and K. Horimoto, Completing networks using observed data, *Proc. 20th International Conference on Algorithmic Learning Theory (ALT 2009)*, *Lecture Notes in Artificial Intelligence* 5809, 126-140, 2009.

総説等

15. T. Akutsu, M. Hayashida and T. Tamura, Algorithms for inference, analysis and control of Boolean

networks (tutorial paper), Proc. 3rd International Conference on Algebraic Biology (AB 2008), Lecture Notes in Computer Science 5147, 1-15, 2008.

16. 阿久津達也：遺伝子ネットワークの離散モデルと制御，計測と制御，Vol. 47, No. 8, 664-669, 2008.
17. T. Akutsu and W-K. Ching, Analysis and control of deterministic and probabilistic Boolean networks, Elements of Computational Systems Biology (edited by Huma M. Lodhi and Stephen H. Muggleton), John Wiley & Sons, Inc., pp. 235-255, 2010.

学会発表（国際学会）

1. T. Akutsu, M. Hayashida, W-K. Ching and M.K. Ng, On the complexity of finding control strategies for boolean networks, 4th Asia-Pacific Bioinformatics Conference (APBC 2006), 2006.
2. T. Akutsu, M. Hayashida, S-Q. Zhang, W-K. Ching and M. K. Ng, Finding incoming global states in Boolean networks, 5th IEEE International Workshop on Genomic Signal Processing and Statistics (GENSIPS07), 2007.
3. M. Hayshida, F. Sun, S. Aburatani, K. Horimoto and T. Akutsu, Integer programming- based approach to allocation of reporter genes for cell array analysis, 1st International Symposium on Optimization and Systems Biology (OSB 2007), 2007.
4. T. Tamura and T. Akutsu, An improved algorithm for detecting a singleton attractor in a Boolean network consisting of AND/OR nodes, 3rd International Conference on Algebraic Biology (AB 2008), 2008.
5. T. Tamura, K. Takemoto and T. Akutsu, Measuring structural robustness of metabolic networks under a Boolean model using integer programming and feedback vertex sets, The 2nd International Workshop on Intelligent Informatics in Biology and Medicine (IIBM 2009), 2009.
6. T. Akutsu, M. Hayashida and T. Tamura, Integer programming-based methods for attractor detection and control of Boolean networks, The combined 48th IEEE Conference on Decision and Control and 28th Chinese Control Conference (IEEE CDC/CCC 2009), 2009.

（国内学会）

7. 田村武幸, 阿久津達也: AND/OR 節点で構成されるブーリアンネットワークの定常状態を検出する $O(1.787^n)$ 時間アルゴリズム, 電子情報通信学会 コンピューテーション研究会, 福岡, 2007年5月25日.
8. 林田守広, 孫富艶, 油谷幸代, 堀本勝久, 阿久津達也: Integer programming-based approach to allocation of reporter genes for cell array analysis, 情報処理学会 バイオ情報学研究会, 函館, 2007年9月13日.
9. 阿久津達也: 遺伝子ネットワークの離散モデルとその制御, 第2回 SICE 生物制御システム調査研究会, 京都, 2008年1月31日.
10. 田村武幸, 竹本和広, 阿久津達也: Measuring structural robustness of metabolic networks by integer programming, 日本バイオインフォマティクス学会年会, 千里, 2008年12月15日.
11. 林田守広, 田村武幸, Wai-Ki Ching, Cong Yang, 阿久津達也: Probabilistic Boolean network attractor identification and a relationship to attractor distribution in Boolean networks, 東京, 2009年3月6日.
12. 阿久津達也, 林田守広, 田村武幸: Analyzing Boolean networks by using integer programming, 電子情報通信学会コンカレント工学研究会, 東京, 2009年8月7日.
13. 田村武幸, Cong Yang, 阿久津達也, Wai-Ki Ching: Efficient computation of impact degrees for multiple reactions, 札幌, 2009年9月18日.

9. 山口大学 (産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 (つくば) 平野氏グループの成果を併せて記載)

論文

(2006～2007)

1. Soichiro Saito, Mila Ghosh, Keiko Morita, Takashi Hirano, Masanao Miwa and Takeshi Todoroki: The genetic differences between gallbladder and bile duct cancer cell lines, *Oncol Rep.* 16(5), 949-956, Nov., 2006.
2. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Sato T, Ikemoto K, Ikeda E, Sasaki K.: Chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in patients with colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2007 Jan;17(1):261-7.
3. Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, Furuya T, Oga A, Naito K, Sasaki K.: Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Apr 1;174(1):42-7.
4. Matsuyama H, Oba K, Matsuda K, Yoshihiro S, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiyama K, Takei M, Yamaguchi A, Sasaki K, Naito K.: Haploinsufficiency of 8p22 may influence cancer-specific survival in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Apr 1;174(1):24-34.
5. Nakao M, Okada T, Ikemoto K, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K.: The Development of a Novel Method for the Classification of the aCGH Profiles Based on Genomic Alterations *Bull Yamaguchi Med Sch* 2006 ; 53. : 37 – 43
6. Furuya T, Uchiyama T, Adachi A, Chochi Y, Oga A, Kawauchi S, Ishiglo K, Sasaki K.: Relation of DNA ploidy to genetic aberrations detected by chromosomal CGH and FISH in gastric adenocarcinomas. *Oncol Rep.* 2006 Jun;15(6):1491-6.
7. Noutomi Y, Ita M, Okafuji M, Uchida K, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Ueyama Y, Sasaki K.:Comparative genomic hybridization reveals genetic progression of oral squamous cell carcinoma from dysplasia via two different tumorigenic pathways *Journal of Pathology* 2006;210: 67-74
8. Ohguri T, Hisaoka M, Kawauchi S, Sasaki K, Aoki T, Kanemitsu S, Matsuyama A, Korogi Y, Hashimoto H.: Cytogenetic analysis of myxoid liposarcoma and myxofibrosarcoma by array-based comparative genomic hybridization. *Journal of Clinical Pathology* 2006 Sep;59(9):978-83
9. Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu X-P, Ikemoto K, Oga A, Naito K, Sasaki K.: Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability.*Clinical Cancer Research* 2006;12:2752-2758
10. Uchida K, Oga A, Okafuji M, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ueyama Y, Sasaki K.: Molecular cytogenetic analysis of oral squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 167(2): 109-116
11. Toshimitsu H, Iizuka N, Yamamoto K, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K.: Molecular features linked to the growth-inhibitory effects of gemcitabine on human pancreatic cancer cells. *Oncology Report* Dec;16(6):1285-91.
12. Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Matsumoto H, Nagao K, Ohmi C, Sakano S, Furuya T, Oga A, Naito K. Sasaki K.: Overexpression of polo-like kinase 1(PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer. *Oncology* 70:231-237, 2006
13. Kawauchi S, Yamamoto Y, Uchida K, Chochi Y, Kondo T, Oga A, Sasaki K.: Significance of cyclin E and p27 expression in malignant ovarian germ cell tumors: Correlation with the cell proliferation activity and clinicopathologic features. *Oncol Rep.* 2006 Nov;16(5):1029-33.

14. Akao J, Matsuyama H, Yamamoto Y, Sasaki K, Naito K.: Chromosome 20q13.2 gain may predict intravesical recurrence after nephroureterectomy in upper urinary tract urothelial tumors. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12(23):7004-8.

(2008)

15. Suehiro Y, Okada T, Anno K, Okayama N, Ueno K, Hiura M, Nakamura M, Kondo T, Oga A, Kawauchi S, Hirabayashi K, Numa F, Ito T, Saito T, Sasaki K, Hinoda Y., Aneuploidy predicts outcome in patients with endometrial carcinoma and is related to lack of CDH13 hypermethylation., *Clinical Cancer Research* 2008; Jun 1;14(11):3354-61.

16. Kawauchi S, Tomoko Furuya T, Motonao Nakao M, Kenzo Ikemoto K, Atunori Oga, Sasaki K., A simple method for enhancing hybridization efficiency in chromosome and array comparative genomic hybridization., *BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY* 2008 (IN PRESS)

17. Kawauchi S, Kusuda T, Liu XP, Suehiro Y, Kaku T, Mikami Y, Takeshita M, Nakao M, Chochi Y, Sasaki K., Is Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia a Cancerous Precursor of Minimal Deviation Adenocarcinoma?: A Comparative Molecular-genetic and Immunohistochemical Study., *Am J Surg Pathol.* 2008 Dec;32(12):1807-1815.

18. Furuya T, Uchiyama T, Adachi A, Okada T, Nakao M, Oga A, Kawauchi S, Kang JJ, Yang S-J, Sasaki K, The development of a mini-array for estimating the disease states of gastric adenocarcinoma by array CGH., *BMC Cancer* 2008, 8:393

19. Yasuyo Chochi, Shigeto Kawauchi, Motonao Nakao, Tomoko Furuya, Kiichiro Hashimoto, Atunori Oga, Masaaki Oka, and Kohsuke Sasaki, A copy number gain of the 6p arm is linked with advanced hepatocellular carcinoma., *J Pathol* 2008; 9:16AM

20. Liu XP, Li DY, Liu XL, Xu JD, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Sasaki K., Comparison of chromosomal aberrations between primary tumors and their synchronous lymph-node metastases in intestinal-type gastric carcinoma., *Pathol Res Pract.* 2008 Nov 26.

(2009)

21. Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Uchiyama T, Adach J, Okada T, Ikemoto K, Oga A, Sasak K., Identification of chromosomal regions with DNA copy number aberrations associated with node metastasis of colorectal adenocarcinomas based on the array CGH profiles., *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 181(2): 70-76

22. Matsuyama H, Yamamoto Y, Nagao K, Ohmi C, Sakano S, Sasaki K., Cytogenetic analysis of false-positive mucosa by photodynamic diagnosis using 5-aminolevulinic acid - possible existence of premalignant genomic alterations examined by in vitro experiment. *Oncology.* 2009;76(2):118-25.

23. Kawauchi S, Sakai H, Ikemoto K, Eguchi S, Nakao M, Takihara H, Shimabukuro T, Furuya T, Oga A, Matsuyama H, Takahashi M, Sasaki K. 9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology. *Hum Pathol.* 2009;40(12):1783-9.

24. Yamamoto Y, Eguchi S, Junpei A, Nagao K, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Intercellular centrosome number is correlated with the copy number of chromosomes in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009;191(1):38-42.

(2010)

25. Katumi Tsuji, Shigeto Kawauchi, Soichiro Saito, Tomoko Furuya, Kenzo Ikemoto, Motonao Nakao, Shigeru Yamamoto, Masaaki Oka, Takashi Hirano, Kohsuke Sasaki., 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)

学会発表、講演
(2006～2007)

1. Tomoko Furuya, Tetuji Uchiyama, Atsushi Adachi, Yasuyo Chochi, Atsunori Oga, Shigeto Kawauchi, Kohsuke Sasaki: Genetic aberrations detected by array CGH depends on DNA ploidy, XXIII International Society For Analytical Cytology Congress, Canada, May 20-24, 2006.
2. (招聘) Sasaki K.: Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of solid tumors, The 32nd Annual Meeting of Korean Cancer Association, Seoul, June 15-16, 2006.
3. 平崎重雄、野口 剛、大貫順子、森田桂子、田中文明、三森功士、佐々木 淳、井上 裕、杉原健一、平野 隆、森 正樹: アレイ CGH を用いた食道癌におけるゲノム変化の検索、第 60 回日本食道学会、平成 18 年 6 月 30 日.
4. 古屋智子: 半導体ナノ粒子とフローサイトメトリー・cell Lab Quanta SC による測定、第 16 回日本サイトメトリー学会、平成 18 年 7 月 7 日.
5. 小賀厚徳、河内茂人、古屋智子、河野和明、加藤智栄、佐々木功典: Tissue microarray を用いた癌の研究、第 16 回日本サイトメトリー学会、平成 18 年 7 月 7 日.
6. 末広 寛、古屋智子、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典、濱中裕一郎、日野田祐治: 子宮内膜癌における CGH 法の臨床検査応用の可能性、第 16 回日本サイトメトリー学会、平成 18 年 7 月 7 日.
7. 松村耕治、丸田明枝、土田信夫、佐々木功典、松山重雄: 頭頸部癌細胞株における side population 細胞の遺伝子プロファイル解析、第 16 回日本サイトメトリー学会、平成 18 年 7 月 7 日.
8. 古屋智子、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典: 染色体不安定性からみた胃癌における DNA ploidy、第 16 回日本サイトメトリー学会、平成 18 年 7 月 8 日.
9. 平野 隆、齋藤総一郎、森田桂子、藤田聡史、三宅 淳: BAC array CGH analysis of human breast cancer cell lines, 第 24 回日本ヒト細胞学会、平成 18 年 7 月 30 日.
10. 平野 隆、森田桂子、齋藤総一郎、小原有弘、水澤 博: Analysis of chromosomal alterations in long-term cultured HeLa cells and its sub-strains by BAC Array CGH, 第 24 回日本ヒト細胞学会、平成 18 年 7 月 30 日.
11. 平崎重雄、井上 裕、平野 隆、野口 剛、杉原健一、森 正樹: Cancer-death related genomic aberration of esophageal squamous cell carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization, 第 11 回国際癌転移学会・第 15 回日本がん転移学会合同会、平成 18 年 9 月 3 日.
12. 齋藤総一郎、平野 隆、三輪正直、轟 健: The genetic differences between gallbladder and bile duct cancer cell lines, 第 65 回日本癌学会総会、平成 18 年 9 月 28 日.
13. 平野 隆、齋藤総一郎、鈴木 貴、笹野公伸、佐々木功典: ヒト臨床肺癌における BAC Array CGH 解析、第 65 回日本癌学会総会、平成 18 年 9 月 28 日.
14. 納富泰行、小賀厚徳、内田堅一郎、岡藤正樹、上山吉哉、佐々木功典: 上皮異形成から口腔扁平上皮癌へ進展する 2 つの異なった癌進行過程、第 65 回日本癌学会総会、平成 18 年 9 月.
15. 古屋智子、足立 淳、内山哲史、中尾素直、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典: アレイ CGH を用いた胃癌における DNA コピー数異常と DNA ploidy および染色体不安定性との関連についての検討、平成 18 年 9 月.
16. 内田堅一郎、小賀厚徳、岡藤正樹、三原真理子、河内茂人、古屋智子、上山吉哉、佐々木功典: Array-based CGH 法による口腔扁平上皮癌のゲノム解析、平成 18 年 9 月.
17. 松村耕治、丸田明枝、佐々木功典、土田信夫、松山重雄: 頭頸部扁平上皮癌細胞株の side

population 細胞における遺伝子プロファイルの解析、平成 18 年 9 月。

18. 佐々木功典：癌とゲノム異常、第 38 回日本臨床分子形態学会総会学術集会、平成 18 年 9 月 29 日。
19. 古屋智子、足立 淳、内山哲史、中尾素直、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典：アレイ CGH による胃癌の悪性度評価を可能とするゲノムバイオマーカーの研究、第 3 回日本消化管学会総会学術集会、平成 19 年 2 月 1 日。
20. 古屋智子、足立 淳、内山哲史、中尾素直、小賀厚徳、河内茂人、佐々木功典：アレイ CGH を用いた胃癌における DNA コピー数異常と臨床病理学的事項との関連についての研究、第 96 回日本病理学会総会、平成 19 年 3 月 13 日。
21. 内田堅一郎、小賀厚徳、河内茂人、古屋智子、上山吉哉、佐々木功典：Array-based CGH 法による口腔扁平上皮癌の DNA コピー数異常に関する検討、第 96 回日本病理学会総会、平成 19 年 3 月 14 日。
22. 江口 賢、帖地康世、山本義明、古屋智子、小賀厚徳、河内茂人、松山豪泰、内藤克輔、佐々木功典：Array-based CGH 法による膀胱癌 DNA コピー数の異常の検討、第 96 回日本病理学会総会、平成 19 年 3 月 14 日。
23. 河内茂人、近藤智子、小賀厚徳、佐々木功典：子宮体部に発生した HMB-45 免疫染色陰性の血管周囲類上皮細胞性腫瘍 (PEComa) の一例、第 96 回日本病理学会総会、平成 19 年 3 月 15 日。
24. (教育講演) 第 17 回日本サイトメトリー学会 (浦安 ; 2007 年 7 月 5-6 日)、「サイトメトリーと細胞周期：温故知新」、佐々木功典

(2008)

25. 第 94 回日本消化器病学会総会 (福岡 5.8-10)、染色体不安定を呈する aneuploid 胃癌は 22q11.23 のコピー数減少を呈する：内山哲史、足立淳、佐々木功典
26. XXIV International Society for Analytical Cytology (May 17-21, Budapest, Hungary) Furuya T, Nakao M, Chochi Y, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K Cytometric quantification of the expression level of intracellular molecules with semiconductor quantum dots.

(2009)

27. (教育講演) 第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会 (10 月 30-31 日、福岡)、「ゲノム異常からみたがん細胞」、佐々木功典
28. 第 19 回日本サイトメトリー学会 (6.20-21、松江)、ワークショップ：DNA ploidy と染色体不安定性(CIN)、ゲノムコピー数異常、佐々木功典

10. バイオインダストリー協会

学会発表

1. Fujita, S., Takano, K., Toyoda, C., Mika, N., Miyake, M., Screening and Identify of the siRNAs for Sensitizing TRAIL-Resistant HeLa Cells, Asia Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC'09), Kobe, Hyogo, Japan, 2009. 11. 24-28, (Oral)
2. 藤田聡史、高野幸太、樋田智都子、袴田和巳、三宅正人、三宅淳、一細胞時系列計測による TRAIL 耐性 HeLa 細胞の感受化に関わる siRNA の評価、第 61 回日本生物工学会、名古屋市千種区、2009.9.23-25、(口頭発表)
3. 長崎 (大貫) 玲子、栗木直美、袴田和巳、長崎晃、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、細胞運動評価チップを用いた細胞運動に関わるキノームの解析、第 61 回日本生物工学会、名古屋市千種区、

2009.9.23-25、(口頭発表)

4. 大貫(長崎) 玲子、栗城直美、袴田和巳、長崎晃、藤田聡史、三宅正人、三宅淳、細胞チップを用いた細胞運動関連遺伝子群の網羅的探索、BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、兵庫県神戸市、2008.12.9-12、(ポスター発表)

II. アステラス製薬

特許

1. WO2006/083016

論文

1. Efficient delivery of siRNA using dendritic poly(L-lysine) for loss-of-function analysis. *Journal of Controlled Release* 126(1), 59-66 (2008)

研究発表・講演、その他の公表(プレス発表等) なし

III. エーザイ、岡山大学

特許 なし

論文

1. Kuriyama, M., Matsushita, M., Tateishi, A., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Ishino, K., Sano, S., and Matsui, H. A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. *Chem. Biol. Drug Des.* 67: 238-243, 2006.
2. Inoue, M., Tomizawa, K., Matsushita, M., Lu, Y.-F., Yokoyama, T., Yanai, H., Takashima, A., Kumon, H., and Matsui, H. p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *Eur. Urol.* 49: 161-168, 2006.
3. Wu, Y., Liang, S., Oda, Y., Ohmori, I., Nishiki, T., Takei, K., Matsui, H., and Tomizawa, K. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. *EMBO J.* 26, 2981-2990, 2007.
4. Kitani, K., Oguma, S., Nishiki TI, Ohmori, I., Galons, H., Matsui, H., Meijer L., and Tomizawa, K. A Cdk5 inhibitor enhances induction of insulin secretion by exendin-4 both in vitro and in vivo. *J. Physiol. Sci.* 57, 235-239, 2007.
5. Yamada, H., Ohashi E., Kusumi N., Li, S.-A., Yoshida Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Kashiwakura, Y., Kumon, H., Matsui H., and Takei K. Amphiphysin I is important for actin polymerization during phagocytosis. *Mol. Cell Biol.* 18, 4669-4680, 2007.
6. Tsutsui, Y., Tomizawa, K., Nagita, M., Nishiki, T., Ohmori I., Seno M., and Matsui, H. Development of bionanocapsules targeting brain tumors. *J. Control. Release* 122, 159-164, 2007.
7. Liang, S., Wei, F.-Y., Wu, Y.-M., Tanabe K., Abe, T., Oda, Y., Yoshida, Y., Yamada, H., Matsui, H., Tomizawa, K., and Takei, K. Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis. *J. Neurochem.* 102, 1466-1476, 2007.
8. Ogawa, N., Ono, S., Ichikawa, T., Arimitsu, S., Onoda, K., Tokunaga, K., Sugi, K., Tomizawa, K., Matsui, H., and Date, I. Novel protein transduction method by using 11R. An effective new drug delivery system for the treatment of cerebrovascular diseases. *Stroke* 38, 1354-1361, 2007

9. Ishihama, Y., Wei, F.-Y., Aoshima, K., Sato, T., Kuromitsu, J., and Oda, Y. Enhancement of the Efficiency of Phosphoproteomic Identification by Removing Phosphates after Phosphopeptide Enrichment, *J. Proteome Res.*, 6, 1139-44, 2007.
10. Han, X.-J., Lu, Y.-F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Tomizawa, K., Nairn, A. C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. CaM kinase 1a-induced phosphorylation of DRP1 regulates mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.*, 2008, in press.
11. Han, X.-J., Lu, Y.-F., Li, S.A., Tomizawa, K., Takei, K., Matsushita, M., Matsui, H. Involvement of calcineurin in glutamate-induced mitochondrial dynamics in neurons. *Neurosci Res.* 60, 114-119, 2008.
12. Nakamura, T., Kuromitsu, J., and Oda, Y. Evaluation of Comprehensive Multidimensional Separations using Reversed-Phase, Reversed-Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Shotgun Proteomics, *J. Proteome Res.*, 7, 1007-1011, 2008.

研究発表・講演

1. 遺伝子・デリバリー研究会 5周年記念国際シンポジウム、道上 宏之、富澤 一仁、魏 范研、松下 正之、陸 雲飛、市川 智継、伊達 勲、松井 秀樹. エンドソームリリーシングメインを利用した p53 蛋白質導入法、2005 年 5 月 21 日 (東京)。
2. US HUPO 2005, 2nd Annual Conference、小田吉哉、Integrated Strategy for Shotgun Phosphoproteomics、2006 年 3 月 13 日(Boston, MA)。
3. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics、小田吉哉、Large-Scale Data Evaluation of Mass Spectra for Shotgun Phosphoproteomics、2006 年 5 月 31 日 (Seattle, WA)。
4. 第 58 回日本生理学会中四国地方会、筒井佑美、富澤一仁、西木禎一、大守伊織、名木田真奈、妹尾昌治、松井秀樹. 脳腫瘍を標的としたバイオナノカプセルの開発、2006 年 10 月 20 日 (岡山)
5. 山口大学大学院医学系研究科応用分子生命科学産学公連携セミナー:「明日を生む生命科学の学際教育」、小田吉哉、プロテオミクスと創薬研究、2007 年 3 月 10 日 (山口)
6. 第 232 回薬学研究科セミナー/東北大学 21 世紀 COE プログラム『医薬開発統括学術分野創生・人材育成拠点』共催、小田吉哉、バイオロジカルマススペクトロメトリーと創薬プロテオミクス、2007 年 3 月 16 日 (仙台)
7. 第 55 回質量分析総合討論会ランチョンセミナー、小田吉哉、LC/MS とリン酸化プロテオミクス、2007 年 5 月 17 日 (広島)
8. NEDO「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」ワークショップ、富澤 一仁. 蛋白質導入法による細胞機能制御、2007 年 5 月 31 日 (東京)
9. ゲノムテクノロジー第 164 委員会第 23 回研究会、小田吉哉、今、プロテオームで何ができるか?、2007 年 6 月 12 日 (東京)
10. 産学官連携を指向した最前線セミナー「分子細胞イメージングと疾患・創薬研究・研究を加速するバイオイメージング技術とその応用」、富澤 一仁. 蛋白質導入法の分子イメージングへの応用、2007 年 7 月 12 日 (東京)
11. Harvard University Medical School & Children's Hospital Seminar、小田吉哉、Proteomics for drug discovery-From technology development to pharmaceutical application-、2007 年 8 月 7 日(Boston, MA)
12. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、小田吉哉、Technical challenges of proteomics to contribute life science、2007 年 12 月 12 日 (横浜)

その他の公表 (プレス発表等) なし

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日

産業技術環境局

製造産業局

1. 目的

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

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

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

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

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

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

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

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

○新経済成長戦略のフォローアップと改訂（2008年9月19日閣議決定）

2006年6月に経済産業省がとりまとめた「新経済成長戦略」を、資源価格の高騰等の構造変化を踏まえフォローアップと改訂を行った。「資源生産性競争」時代における経済産業構造の構築、世界市場獲得と持続的発展のためのグローバル戦略の再構築、地域・中小企業・農林水産業・サービスの未来志向の活性化を3つの柱として、「新経済成長戦略」を強化した。

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

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

○「イノベーション25」（2007年6月閣議決定）

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

○がん対策推進基本計画（2007年6月閣議決定）

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

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

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

3. 達成目標

- ①医薬品開発の成功確率の向上に資する技術開発や、基礎研究から臨床への橋渡し研究等を通じた、医薬品の上市期間の短縮や開発コストの低減を図る。
- ②再生医療の早期実現を目標とし、産業化を促進する。
- ③医療機器¹など先進的な技術開発等の推進による国際競争力の強化、厚生労働省との連携事業（医療機器開発ガイドラインの策定など）による開発から製品に至るまでの期間の短縮等を達成する。
- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

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

①概要

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

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

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

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）

①概要

がん対策等の国民医療高度化を目指し、急速に発展している多様なバイオ技術の融合と医療現場への円滑な橋渡しによるイノベーションの創出・加速のため、総合科学技術会議のもと文部科学省及び厚生労働省と連携し、橋渡し研究の強化に一体的に取り組む。具体的には、民間企業と臨床研究機関（文部科学省や厚生労働省が整備する橋渡し研究拠点等）が一体となっていく、医薬品、医療機器、診断ツール等の開発を推進する。

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2009年度～2013年度

(7) 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発

①概要

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

②技術目標及び到達時期

2014年度までに、後天的ゲノム修飾解析技術開発として、極微量サンプルに対応

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

③研究開発期間

2010年度～2014年度

I-2. 診断ツールの開発

(1) 個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(2) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）【再掲】

(3) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

I-3. 創薬・診断に係る基盤整備

(1) 統合データベースプロジェクト

①概要

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

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

え、統合化し、産業界等に提供する。

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2008年度～2010年度Ⅱ. 再生医療

Ⅱ. 再生医療

Ⅱ-1. 再生医療の実用化

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

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金) 【再掲】

Ⅱ-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

医療機器産業への投資、新規企業参入、医療機器研究開発の促進及び薬事法審査の円滑化・迅速化にも資する「医療機器開発ガイドライン」を厚生労働省との連携

の下、産学の協力を得て、個別の機器ごとに策定し、国内での機器開発促進の環境整備を図るとともに、医療機器産業に製品として、または部品・部材の供給として参入しやすい環境を整備するための方策を検討し、医療機器分野の活性化・国際競争力の強化を図る。

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(1) がん超早期診断・治療機器総合研究開発プロジェクト（運営費交付金）

① 概要

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

② 技術目標及び到達時期

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

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

③ 研究開発期間

2010年度～2014年度

（うち、内視鏡下手術支援システムは 2007年度～2011年度）

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

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

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2010年度～2014年度

III-2. 医療機器の開発に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業【再掲】

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2008年度～2010年度

IV.福祉機器

IV-1. 福祉機器の開発

(1) 福祉用具実用化開発推進事業（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

1993年度～

IV-2. 福祉機器の開発に係る基盤整備

(1) 福祉機器情報収集・分析・提供事業

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

1993年度～

5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）

[標準化]

・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。具体的には、統合データベースの情報やインター

ネットに公開されている情報資源等を相互運用するために、必要なデータ形式、フォーマット等の標準化を推進する。

・高齢者等支援機器については、関係省庁との緊密な連携の下、標準化等の手法による実用化及び普及の方策を検討する。

[導入普及促進]

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

[産業間連携]

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

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

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

[プロジェクト等間の連携について]

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

・ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発（創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発）については、「生体高分子立体構造情報解析」の成果を活用することで、膜

タンパク質やその複合体の構造情報を取得する新たな技術等の開発に向けて、タンパク質の立体構造及びその構造変化や膜タンパク質複合体の構造情報等の解析及び構造情報を基にした高精度なシミュレーション技術を開発する。

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

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

[関係機関との連携]

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

[その他]

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

・医療機器の審査体制の強化による薬事法審査の迅速化の観点から、2004年より独立行政法人産業技術総合研究所の工学系研究者を独立行政法人医薬品医療機器総合機構へ派遣しているところである。

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

6. 研究開発の実施に当たっての留意事項

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

なお、適切な時期に、実用化・市場化状況等について検証する。

7. 改訂履歴

(1) 平成12年12月28日付けがん・心疾患等対応高度医療機器プログラム制定。

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

- (3) 平成14年2月28日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。がん・心疾患等対応高度医療機器プログラム(平成12・12・27工総第13号)は、廃止。
- (4) 平成15年1月27日付け健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成14・02・25産局第4号)は、廃止。
- (5) 平成15年3月10日付け健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画制定。健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成14・02・05産局第2号)は、廃止。
- (6) 平成16年2月3日付け制定。健康維持・増進のためのバイオテクノロジー基盤研究プログラム基本計画(平成15・01・23産局第4号)及び健康寿命延伸のための医療福祉機器高度化プログラム基本計画(平成15・03・07産局第17号)は、本プログラム基本計画に統合することとし、廃止。
- (7) 平成17年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成16・02・03産局第12号)は、廃止。
- (8) 平成18年3月31日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成17・03・25産局第1号)は、廃止。
- (9) 平成19年4月2日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成18・03・31産局第2号))は、廃止。
- (10) 平成20年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成19・03・20産局第5号))は、廃止。
- (11) 平成21年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成20・03・25産局第6号)は廃止。
- (12) 平成22年4月1日付け制定。健康安心プログラム基本計画(平成21・03・26産局第3号)は廃止。

(健康安心イノベーションプログラム)
「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発/
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」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

本研究開発は、創薬に資する基盤技術の開発、再生医療の確立、医療機器・福祉機器の開発等の手段を適切に組み合わせることによって、健康維持増進、疾患の早期診断、及び適切な治療法の帝京を実現し、個の医療を通じた健康寿命の円心、生活の質の向上を図り、今後、成果に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会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」の中の「ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発」の一環として実施する。

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間に大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的とする。

これにより、これまでに蓄積された情報を遺伝子の動的解析に基づき、細胞レベルのネットワーク情報に統合することによって、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すると同時に、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) 研究開発の目標

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用い、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。

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。

(3) 研究開発内容

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

- ・細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

①本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下、「NEDO技術開発機構」という。）が、単独ないし複数の原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

②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。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、必要に応じて、NEDO技術開発機構に設置する委員会及び技術検討会等、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度プロジェクトリーダー等を通じて研究開発の進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の実施期間は、平成17年度から平成21年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義ならびに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の

中間評価を平成19年度、事後評価を平成22年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取り扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発成果のうち、下記共通基盤技術に係る研究開発成果については、NEDO技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

- a) 構築されたレポーター分子
- b) 細胞を用いた動的ネットワーク解析技術
- c) 種々の細胞情報をハンドリングするソフトウェア技術

② 知的基盤整備事業又は標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化等との連携を図るため、データベースへのデータ提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第26条の規定等に基づき、原則として、すべて受託先に帰属させることとする。

④ 成果の産業化

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

(2) 基本計画の変更

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

(3) 根拠法

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

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドラインの策定について」（平成16・12・24製局第1号）を厳守しなければならない。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成17年3月制定。

(2) 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。

(3) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂。

(別紙) 研究開発計画
研究開発項目「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術」

1. 研究開発の必要性

疾患に関わる遺伝子の選別を行うためには、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が、示唆される候補遺伝子の数が数百に及び、その中から真にターゲットとなる遺伝子を同定することが困難であった。これは、解析によって示されるデータが、その時点における個々の遺伝子ごとの情報に分解されて示されているため、疾患に対する遺伝子間の重要度を推測することが難しいことに起因している。

このため、変動する遺伝子群として抽出された個別情報を整理・統合し、多数示される変動遺伝子群の相互関係を示す動的ネットワーク情報を明らかにすることによって、表現型と遺伝子発現情報との相関性を明らかにし、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の同定に有用な解析ツールの開発が必要である。

2. 具体的研究開発内容

刺激に対して細胞が示す応答を利用して、表現型と遺伝子発現情報の相関性から有望な創薬ターゲットの同定を可能とする解析ツールを開発するため、以下の技術開発を行う。

(1) 細胞モニタリング技術開発

DNAチップ解析の結果等から示される多数の変動遺伝子の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や遺伝子発現レポーター等を高効率で導入する技術を開発するとともに、与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術の開発を行う。

(2) 細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を整理・統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性を解析する技術の開発を行う。

(3) 創薬ターゲット同定技術開発

開発した技術を活用し、有望な創薬ターゲット遺伝子を信頼性高く、高効率に同定可能な技術の開発を行う。

3. 達成目標

(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用い、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。

(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。

平成17年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名:(プログラム名)健康安心プログラム

(大項目)モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(中項目)細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

2. 背景及び目的・目標

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的とする。

(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認するとともに、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。

3. 事業内容

(1)平成17年度事業内容

刺激に対して細胞が示す応答を利用して、表現型と遺伝子発現情報の相関性から有

望な創薬ターゲットの同定を可能とする解析ツールを開発するため、以下の技術開発を行う。

細胞モニタリング技術開発

DNAチップ解析の結果等から示される多数の変動遺伝子の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や遺伝子発現レポーター等を高効率で導入する技術の開発及び与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術の開発に着手する。

細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性を解析する技術の開発に着手するため、必要なデータの取得と情報の取り扱い方法に関する検討に着手する。

創薬ターゲット同定技術開発

開発した技術を活用し、有望な創薬ターゲット遺伝子を信頼性高く、高効率に同定可能な技術の開発を行うために必要な仕様の抽出を進める。

(2) 平成 17 年度事業規模

一般会計

237 百万円（新規）

4 . その他重要事項

(1) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドラインの策定について」(平成 16・12・24 製局第 1 号)を厳守しなければならない。

(2) 複数年度契約の実施

平成 17～19 年度の複数年度契約を行う。

(3) 年間スケジュール

平成 17 年 3 月上旬・・・部長会

3 月上旬・・・運営会議

3 月中旬・・・公募開始

4 月中旬・・・公募〆切

6 月上旬・・・契約・助成審査委員会、採択決定

なお、応募総数が多い場合等、特段の事情がある場合を除き、公募締切から原則 45 日以内での採択決定を行う。

(注) 事業規模については、変動があり得る。

平成18年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心プログラム

(大項目) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目) モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目) 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的とする。

(1) 最終目標 (平成21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用い、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。

(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。

4. 実施内容及び進捗 (達成) 状況

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施している。また、外部有識者を含めた研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

(1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

本年度は乳ガン細胞を対象として遺伝子パスウェイ解析を行うための基盤技術の確立を行った。即ち、臨床ガン患者のデータを用いて、解析対象の候補遺伝子を絞り込んだ。また、パスウェイ解析を行うためのモデル細胞を株化細胞から選定し、その細胞株の遺伝子構造の解析を進めており、今年度中に終了させる予定である。遺伝子解析を行うための装置であるトランスフェクションアレイ (TFA) 装置を、当該細胞種に適応させるための条件検討を行い、培養条件、遺伝子導入条件を確立した。次年度から上記パスウェイ解析を効率的・大規模に実施するための方法開発および条件検討のために、1500種類以上の遺伝子に対する制御とその解析技術を開発した。TFA 装置から得られた顕微鏡画像から細胞の状態・パスウェイ制御の効果を自動的に判定するための情報処理方法を開発し、大規模解析のための準備を進めた。浮遊系の細胞への展開、皮膚癌などへの展開のための研究を進めた。

具体的には、癌研および協和発酵のチームにおいては、これまでの臨床細胞を用いて得られた遺伝子データから統計解析を行い、50種類以上の候補遺伝子を絞り込んだ。また、臨床サンプルから、患者のガン細胞と同じ遺伝子挙動を有し、培養可能であり、その性質が安定で、普遍的に遺伝子実験に用いることのできる細胞株 (臨床モデル細胞) の樹立を進めている。癌研、産総研、東大を中心とする集中研においては、上記遺伝子に対して、36種類の siRNA を作成した。また12種類のプライマーを作成した。また、産総研 TERC では1500種類の siRNA を用いて、アポトーシス促進遺伝子162種類を抽出した。産総研 BRF/山口大では、培養がん細胞のゲノム解析に関する研究開発 (乳がん細胞株) のためのモデル細胞として8種類の ATCC が提供する株化細胞を選び、その CGH 解析を進め、すでにそのうち2種類については完了した。産総研 TERC/RICE では上記の他に、TFA を本プロジェクトに適応するために、用いる細胞種に対してそれぞれ最適化をすすめた。上記8種類の細胞について、効率よく遺伝子導入と解析が可能となるようにシステムを調整した。また、その効率などを実際の実験で評価した。産総研 CBRC と京大のチームにおいては、TFA チップ上のヒト細胞の全自動画像解析システムを開発した。具体的には18パラメーター自動解析方法を開発し、神経細胞の分化誘導などの系を用いて細胞の自動評価技術としての有効性を明らかにした。

東大長棟 G および鷺津 G においては、浮遊系細胞の固定化技術を評価し、最適化を行った。チップ上に遺伝子がプリントされている場合のみ、固定化された細胞に遺伝子を導入されるのを確認した。また、固定化された細胞に cDNA および siRNA を導入することができた。さらに、遺伝子をインクジェットプリンターでマイクロプリンティングすることによって、高密度の遺伝子発現細胞マイクロアレイを実現することができた。

カネボウにおいては、ヒト皮膚由来初代培養細胞の樹立（表皮細胞と線維芽細胞）をすすめて、7株を確立した。さらに、この種の細胞を研究に用いる場合に、着目すべき候補遺伝子の絞り込みを行い、DNA 修復関連遺伝子から 335 遺伝子を選定した。

（実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、財団法人バイオインダストリー協会、財団法人癌研究会、協和発酵工業株式会社、株式会社カネボウ化粧品（共同研究：東京大学、再委託：京都大学、山口大学））

（2）リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

高効率な遺伝子導入技術開発として、一般的な方法では導入困難とされた糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対する遺伝子導入方法を EGFP 遺伝子を用いた FACS 法により検討した結果、約 70% の導入効率で遺伝子導入することが可能となり、プロジェクト推進のための基本技術開発を予定を早めて達成した。さらに、この技術を用いて、1 つのキナーゼのサブユニットのドミナントネガティブ cDNA を糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に導入可能とした。タンパク発現量から、80～90% の高い導入効率であると推定された。リン酸化アレイシステムによる遺伝子機能評価方法の開発においては、糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対して血糖降下剤を刺激として用いて、刺激による糖産生能変化を経時的変化として観測可能とした。

（実施体制：アステラス製薬株式会社）

（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

各種細胞に対する蛋白質導入法による蛋白・遺伝子導入効率について、本年は、神経系、消化器系ならびに筋肉系細胞への導入効率を検討した。その結果、約 80% の細胞種では 50% 以上の導入効率であった。また、未分化な細胞への導入効率が悪いことが明らかになった。さらに、細胞への蛋白・遺伝子導入効率を向上させるために、レーザー照射によるマクロピノソームリリーシング法の開発に着手し、繊維芽細胞・神経細胞に 440nm 波長のレーザーを照射することによりマクロピノソームに取り込まれた蛋白を細胞内にリリーシングすることに成功した。また、神経系の培養細胞からルーチンの数百種類のリン酸化ペプチドを同定する方法を確立し、その同定結果の制度についても検証を行った。引き続き細胞を刺激した際のリン酸化の変動についても実験を開始し、一度の実験で 200 種類前後のリン酸化ペプチドについて定量をした。現在、各種細胞や組織において、各タンパク質がどの程度発現しているか、あるいは遺伝子発現・抑制を行った際に標的分子がタンパク質レベルでどの程度変動しているか確認するために合成ペプチドを数百種類用意している最中である。

（実施体制：エーザイ株式会社（共同研究：岡山大学））

実績額推移（百万円）：	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
一般会計	387.4				

特許出願件数（件）：	0
論文発表数（報）：	6
フォーラム等（件）：	16

5. 事業内容

（1）平成 18 年度事業内容

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照のこと。

1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

細胞表現型と遺伝子機能の広範な相関ネットワークを解析するために、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と、その情報から創薬ターゲットが関わるパスウェイを解析するための時系列細胞情報解析技術の開発を行い、パスウェイ解析を利用した創薬ターゲット絞込み・同定への有用性を評価するための統合化したシステム (ターゲットバリデーションシステム) を構築する。これらの研究開発によって、創薬の基盤技術になりうる創薬ターゲット同定技術を開発する。

a) 細胞モニタリング技術開発

多数の変動遺伝子と細胞表現型の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や発現レポーター等を高効率で導入する技術、および与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術を開発する。具体的には、トランスフェクションアレイ等を用い、ガンなどの特定の疾患細胞をモデルとして、RNA干渉 (以後RNAiと表記) を用いた特定の遺伝子の機能抑制を行いながら、創薬ターゲット候補および関連遺伝子の発現の時系列データを取得し、遺伝子の挙動と細胞の表現型の関連を詳しくかつ広範に解析する。

b) 細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性、さらに、その情報から疾患治療に効果的なパスウェイを解析する技術を開発する。対象となる遺伝子について無作為に網羅的な解析を行うものではないが、たとえ数個の遺伝子であってもその相関、時系列解析とその時の細胞の状態を画像で記録して解析を行おうとすると、巨大なデータの保存と加工、解析が必要となる。そのために、細胞画像データに基づくパスウェイ解析に適した情報処理技術の開発及び同様に巨大な量となる画像データとパスウェイの抽出などを自動的に行う技術を開発する。

c) 創薬ターゲット同定技術開発

細胞モニタリング技術と細胞情報解析技術を活用して解析したパスウェイ情報に基づき、有望な創薬ターゲットを信頼性高く、高効率に絞り込むことを可能にする技術の開発を行う。具体的には、実際の創薬に用いられる乳ガン臨床モデル細胞及び皮膚由来各種初代培養細胞を用いた創薬ターゲットの絞込み・同定をモデルとして、細胞アレイを活用した創薬ターゲットの同定技術の有効性を評価する。

さらに、上記創薬ターゲットの同定技術が適用できる細胞種については血球系などへ拡張することを目指す。

2) リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

疾患また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、これら導入遺伝子によりもたらされる細胞機能変化を特に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を開発する。平成18年度は特にsiRNAの導入と指標となるタンパク質リン酸化活性のバリデーションに注力する。

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

細胞内に高効率に遺伝子などを導入する技術として、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を開発する。また、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

技術として、培養細胞内の蛋白質リン酸化を網羅的・経時的かつ定量的に解析する質量分析法（定量リン酸化プロテオーム解析法）、ならびに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を開発する。リン酸化については、現在主流の質量分析に頼った分析では処理速度および感度の点で課題が多いため、例えば細胞アレイ、さらには臨床の現場で汎用されるとは考えにくい。そこでまずカタログ化を行い、その情報を基に例えばELISAのための抗体作製、あるいは標的を絞った質量分析解析に活かす。18年度は1000種類のリン酸化ペプチド同定を目指す。また絶対定量値のカタログ化として必要な標準試料（合成ペプチド）を300種類用意する。

(2) 平成18年度事業規模

一般会計

350百万円（継続）

6. その他重要事項

(1) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24製局第1号）を厳守しなければならない。

(2) 本年度のスケジュール

H18年7月 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。

H19年2月 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。

（注）事業規模については、変動があり得る。

平成19年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心プログラム

(大項目) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目) モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目) 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的とする。

(1) 最終目標 (平成21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用い、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。

(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。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施している。また、外部有識者を含めた研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

4. 1 平成18年度までの実施内容

(1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

平成17年度は乳ガン細胞を対象として遺伝子パルス解析を行うための基盤技術の確立を行った。産総研 RICE/TERC では細胞チップ（トランスフェクションアレイ：TFA）を用いて1500種類以上の遺伝子に対する制御・解析技術と、顕微鏡画像から細胞の状態・パルス制御の効果を自動的に判定するための情報処理方法を開発した。癌研および協和発酵のチームにおいては、臨床細胞を用いて得られた遺伝子データから統計解析を行い、50種類以上の候補遺伝子を絞り込んだ。また、患者のガン細胞と同じ遺伝子挙動を有し、培養可能・安定・普遍的に遺伝子実験に用いることのできる細胞株（臨床モデル細胞）の樹立を進めた。産総研 BRF と山口大では、モデルガン細胞として8種類の ATCC 株化細胞を選び、CGH 解析を進めた。産総研 CBRC と京大のチームにおいては、TFA チップ上のヒト細胞の全自動画像解析システムを開発し、神経細胞の分化誘導などの系を用いて細胞の自動評価技術としての有効性を明らかにした。東大・長棟 G および鷺津 G においては、浮遊系細胞の固定化技術を評価し、最適化を行った。固定化された細胞に cDNA および siRNA の導入を行うマイクロアレイを実現した。カネボウ化粧品においては、ヒト皮膚由来初代培養細胞7株を樹立すると共に DNA 修復関連遺伝子から335 遺伝子を選定した。

平成18年度は、① 細胞への遺伝子導入技術に関しては、当該プロジェクトに供する各種株化ガン細胞、不死化正常細胞、正常乳腺上皮細胞、樹立細胞などへの高効率トランスフェクションのためのウェルベース固相系トランスフェクション法を開発した。その結果、導入が著しく困難だった皮膚由来初代培養細胞への siRNA の高効率導入に成功した。細胞アレイで解析対象の乳ガン培養細胞のゲノムレベルの異常について BAC アレイ CGH により詳細な解析を行い、新たな高頻度乳ガン特異的異常部位を見出した。これは遺伝子相関を解析する場合の基盤的情報として有用と考えられた。ガン関連遺伝子、創薬ターゲット遺伝子の絞込み技術の開発に関しては、TRAIL とアポトーシス関連遺伝子に対する siRNA を用いて88枚に及ぶ大量の TFA を用いてその影響を細胞の生存率を計算することにより調べ、遺伝子のピックアップを行った。また、細胞の転移能の評価を見据えた新規 TFA 技術（細胞運動評価チップ）を開発した。

② 時系列データの新規解析技術の開発を進めた。時系列データの取得を行い、一細胞系におけるデータ処理手法および特徴抽出方法の確立を行なった。すなわち、周期の異なる細胞を、コンピュータ上で同期させるとともに、周期非依存的な遺伝子変動を抽出する技術を確立し、時系列分析の基盤を確立できた。時系列分析ではデータが極端に

増加するため、コンピュータによる自動分析、処理技術が必須となる。本プロジェクトでは、個別細胞の認識と自動追跡を行うために、20000 枚の画像を 8 時間で処理できるようにシステムを構築した。また、巨大データ処理のためのデータストレージシステム (200TB 容量) を整備した。さらに、遺伝子相関に関する自動化技術として確率ブーリアンネットワークを計算するアルゴリズムを開発した。

③ ガンなどの臨床細胞を用いての研究では、培養細胞株樹立について、倫理、細胞の入手・取り扱い、細胞株の樹立方法などの決定および保存システムの整備を行った。臨床細胞については分子生物学的特性 (DNA 一次構造および RNA 発現) を解析し、乳ガン培養細胞に適した樹立条件を確立するとともに、これまで 56 例の初代培養中 10 例を株化候補として抽出するに至った。ガン細胞に関する遺伝子発現プロファイリングによりパクリタキセル感受性を規定する 106 個の候補遺伝子を選び、テキストマイニングによるネットワーク解析を行ってその役割の評価を行うと共に、実験的にも重要な遺伝子についての絞込みを進めている。皮膚由来初代培養細胞 (線維芽細胞, 表皮細胞) の樹立もすすめた。健康人および光線過敏症患者各 7 名より UV 応答アレイデータの情報整備システムを構築し、皮膚由来初代培養細胞に対する siRNA の導入条件を確立して遺伝子候補スクリーニングを進めつつある。

④ 浮遊系細胞用 TFA 技術の研究開発を進め、BAM (生体膜アンカーリング試薬) 修飾基板上にヒト白血病細胞株 9 種、ヒトカルシノーマ 3 種、ヒト末梢血単核球画分細胞などについては良好に固定化できること、また正常に増殖できる細胞種のあることを確認した。BAM を使った積層パターンニングにより、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞から成る複合型の血管モデルシートを作製し、さらにこのシートを基板上に固定化した転移性ガン細胞シートの上に重層し、がん細胞の組織浸潤性評価用 TFA チップを作製することに成功するとともに、がん細胞への遺伝子導入に成功した。電界集中型マイクロエレクトロポレーション法を用いた 蛍光タンパク質 EGFP (27KDa) 発現プラスミドの細胞内導入とその発現に成功した。

以上、平成 17~18 年度において、TFA を用いた創薬支援に向けた遺伝子パスウェイ解析を本格的に行うために必要な、細胞株の樹立と評価、TFA の開発、TFA データ前処理技術、候補遺伝子の絞り込み技術等、基盤技術の確立がほぼ完了した。

(実施体制: 独立行政法人産業技術総合研究所、財団法人バイオインダストリー協会、財団法人癌研究会、協和発酵工業株式会社、株式会社カネボウ化粧品 (共同研究: 東京大学、再委託: 京都大学、山口大学))

(2) リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

平成 17 年度は、高効率な遺伝子導入技術開発として、一般的な方法では導入困難とされた糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対する遺伝子導入方法を EGFP 遺伝子を用いた FACS 法により検討した結果、約 70% の導入効率で遺伝子導入することが可能となり、プロジェクト推進のための基本技術開発を予定を早めて達成した。さらに、この技術を用いて、1 つのキナーゼのサブユニットのドミナントネガティブ cDNA を糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に導入可能とした。タンパク発現量から、80~90% の高い導入効率であると推定された。リン酸化アレイシステムによる遺伝子機能評価方法の開発においては、糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対して血糖降下剤を刺激として用いて、刺激による糖産生能変化を経時的変化として観測可能とした。

平成 18 年度は、平成 17 年度に開発した技術を siRNA の導入に発展させた。蛍光標識オリゴ核酸を用いた FACS による導入の最適化により 90% 以上の効率で導入可能とした。さらに、新規な化学構造を有する導入試薬 F を見出した。この導入技術により糖産生経路に深く関与するキナーゼ PEPCK の発現抑制により糖産生が抑制されることを確認し、開発技術が細胞機能に関与する遺伝子の機能検証に応用可能であることを明らかとし

た。また、開発した siRNA の導入と機能検証技術を活用することでメトフォルミン薬効に深く関与する膜タンパク X を見出すと共にマウスキナーゼの siRNA ライブラリーを使った実効性検証を行い開発技術が広く siRNA の機能検証に応用可能であることを明らかとした。さらには、メトフォルミン薬効のリン酸化マーカーをリン酸化アレイによるリン酸化プロファイリングにより見出し、その妥当性検証をモデル動物組織や細胞系での遺伝子発現プロファイル解析と平行して行っている。

以上、平成 17～18 年度において、ラット肝臓由来培養細胞への高効率な遺伝子導入技術を開発し、それを siRNA の導入に発展させることで、リン酸化アレイシステムによる遺伝子機能検証に有効な細胞機能評価系が開発できた。

(実施体制：アステラス製薬株式会社)

(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

平成 17 年度は、各種細胞に対するタンパク質導入法によるタンパク質・遺伝子導入効率について、神経系、消化器系ならびに筋肉系細胞への導入効率を検討した。その結果、約 80% の細胞種では 50% 以上の導入効率であった。また、未分化な細胞への導入効率が悪いことが明らかになった。さらに、細胞へのタンパク質・遺伝子導入効率を向上させるために、レーザー照射によるマクロピノソームリリーシング法の開発に着手し、繊維芽細胞・神経細胞に 440nm 波長のレーザーを照射することによりマクロピノソームに取り込まれたタンパク質を細胞内にリリーシングすることに成功した。また、神経系の培養細胞からルーチン的に数百種類のリン酸化ペプチドを同定する方法を確立し、その同定結果の制度についても検証を行った。引き続き細胞を刺激した際のリン酸化の変動についても実験を開始し、一度の実験で 200 種類前後のリン酸化ペプチドについて定量した。

平成 18 年度は、主に呼吸器、生殖器ならびに上皮系細胞株への蛋白質導入法による蛋白・遺伝子導入効率について検討した。計 78 種類の細胞株について検討した結果、約 80% の細胞株において 50% 以上の導入効率を得られた。また、低毒性マクロピノソームからのリリーシングペプチドの開発を行い、蛋白質導入法の高機能化に成功した。また膜透過性ペプチドならびに RNA 結合蛋白質による新規 siRNA 導入技術開発を行い、培養細胞内の遺伝子をノックダウンすることができた。ヒトガン細胞からは 344 種類のリン酸化ペプチドを同定し、より精力的に行ったマウス神経由来の細胞 Neuro2a からは 1700 種類あまりのリン酸化ペプチドを同定し、マウスの脳からも既に 1400 種類あまりのリン酸化ペプチドを同定した。これらのうち幾つかを岡山大学にて機能解析を開始した。さらにハンチントン病原因遺伝子 Hip1 改変マウスの脳におけるリン酸化状態、発現タンパク質の変化について測定を開始した。タンパク質のカタログ化として、異なるヒト組織由来の癌細胞、HepG2 (肝癌)、HCT116 (大腸癌)、PC9 (肺癌)、MCF7 (乳癌)、DU145 (前立腺癌)、HEK293 (腎癌～測定未完了) について検討を開始し、同定されたタンパク質の種類は各癌細胞とも 1 万種類以上であった。ちなみに DNA マイクロアレイにて HCT116 で発現している遺伝子を調べたところ、約 3 分の 1 が発現しているという結果であった (約 9000 遺伝子中 2900 遺伝子)。発現しているタンパク質のセミ定量を試みた結果、組織が異なるにもかかわらず、約 9 割のタンパク質が共通していた。定量精度を高めるために合成ペプチド 300 種類を用意し、これらを内部標準ペプチドとして、LC/MS による定量測定を開始した。

以上、平成 17～18 年度において、各種培養細胞に高効率に外来 DNA、タンパク質を導入する技術、また取り込まれた DNA、タンパク質をレーザー照射により放出する技術を確立した。また、細胞内リン酸化ペプチドをルーチン的に同定する方法を確立し、約 3400 種の同定を行った。

(実施体制：エーザイ株式会社（共同研究：岡山大学))

4. 2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移（百万円）： 一般会計	306	431 (契約額)			
特許出願件数（件）：	0	2			
論文発表数（報）：	6	31			
口頭発表、その他発表（件）：	16	40			

5. 事業内容

(1) 平成19年度事業内容

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照のこと。

1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

細胞表現型と遺伝子機能の広範な相関ネットワークを解析するために、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と、その情報から創薬ターゲットが関わるパスウェイを解析するための時系列細胞情報解析技術の開発を行い、パスウェイ解析を利用した創薬ターゲット絞り込み・同定への有用性を評価するための統合化したシステム (ターゲットバリデーションシステム) を構築する。これらの研究開発によって、創薬の基盤技術になりうる創薬ターゲット同定技術を開発する。

a) 細胞モニタリング技術開発

多数の変動遺伝子と細胞表現型の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や発現レポーター等を高効率で導入する技術、および与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術を開発する。具体的には、トランスフェクションアレイ等を用い、ガンなどの特定の疾患細胞をモデルとして、RNA干渉を用いた特定の遺伝子の機能抑制を行いながら、創薬ターゲット候補および関連遺伝子の発現の時系列データを取得し、遺伝子の挙動と細胞の表現型の関連を詳しくかつ広範に解析する。平成19年度は特に、初代培養株の時系列解析および一細胞に適した解析技術を開発する。

b) 細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性、さらに、その情報から疾患治療に効果的なパスウェイを解析する技術を開発する。対象となる遺伝子について無作為に網羅的な解析を行うものではないが、たとえ数個の遺伝子であってもその相関、時系列解析とその時の細胞の状態を画像で記録して解析を行おうとすると、巨大なデータの保存と加工、解析が必要となる。そのために、細胞画像データに基づくパスウェイ解析に適した情報処理技術の開発及び同様に巨大な量となる画像データとパスウェイの抽出などを自動的に行う技術を開発する。平成19年度は特に、ネットワーク全体の動力学モデル構築法を確立し、構築されたネットワークを検証するとともに、正確なネットワークを抽出する。

c) 創薬ターゲット同定技術開発

細胞モニタリング技術と細胞情報解析技術を活用して解析したパスウェイ情報に基づき、有望な創薬ターゲットを信頼性高く、高効率に絞り込むことを可能にする技術の開発を行う。具体的には、実際の創薬に用いられる乳ガン臨床モデル細胞及び皮膚

由来各種初代培養細胞を用いた創薬ターゲットの絞り込み・同定をモデルとして、細胞アレイを活用した創薬ターゲットの同定技術の有効性を評価する。

さらに、上記創薬ターゲットの同定技術が適用できる細胞種については血球系などへ拡張することを目指す。平成19年度は特に、薬剤感受性規定因子（ネットワーク）について、各因子の機能と薬効発現機序との関連の検証を行う。

2) リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

疾患また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、これら導入遺伝子によりもたらされる細胞機能変化を特に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を開発する。平成19年度は特に、平成18年度に開発したsiRNAの機能検証技術を発展させてキナーゼとフォスファターゼのsiRNAのセットの評価を行いリン酸化マーカーの妥当性検証を進めると共に遺伝子やsiRNAの機能検証技術として検討する。さらに、メトフォルミンの薬効を示すと予想されるリン酸化マーカーの妥当性の検証を阻害剤等を使った方法から進め、siRNAの機能検証への活用を図ることを検討する。

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

細胞内に高効率に遺伝子などを導入する技術として、ポリアルギニンによるタンパク質導入法、膜透過性ペプチド核酸(PNA)を利用した遺伝子導入法を開発する。また、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として、培養細胞内のタンパク質リン酸化を網羅的・経時的かつ定量的に解析する質量分析法(定量リン酸化プロテオーム解析法)、ならびに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を開発する。リン酸化については、現在主流の質量分析に頼った分析では処理速度および感度の点で課題が多いため、例えば細胞アレイ、さらには臨床の現場で汎用されるとは考えにくい。そこでまずカタログ化を行い、その情報を基に例えばELISAのための抗体作製、あるいは標的を絞った質量分析解析に活かす。平成19年度は特に、本プロジェクトで開発したタンパク質、遺伝子ならびにsiRNA導入技術を細胞アレイに応用することを実現化させるための開発研究を実施する。具体的には、本技術を用いたアレイチップの開発を行う。また新しく開発したsiRNA導入技術の高機能化(低毒性化、遺伝子発現制御・同期化、タンパク質replacement技術開発)を行う。これまで同定できたリン酸化ペプチドのカタログ化を行い、高感度で高速なリン酸化タンパク質の同定に役立てるとともに、新規コンセンサス配列の発見や相当するリン酸化酵素の同定を試みる。Hip1改変マウスについてタンパク質レベルだけでなく、遺伝子レベルでの変化をDNAマイクロアレイによる解析も行うことで、プロテオミクスとトランスクリプトミクス、可能であればメタボロミクスも合わせた情報の統合化から、今後はより少ない労力でより多くの情報が得られるようなシステム構築を追及する。

(2) 平成19年度事業規模

一般会計 319百万円(継続)

(注) 事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成19年7月（予定）に実施する。

（2）運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を厳守しなければならない。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24製局第1号）を厳守しなければならない。

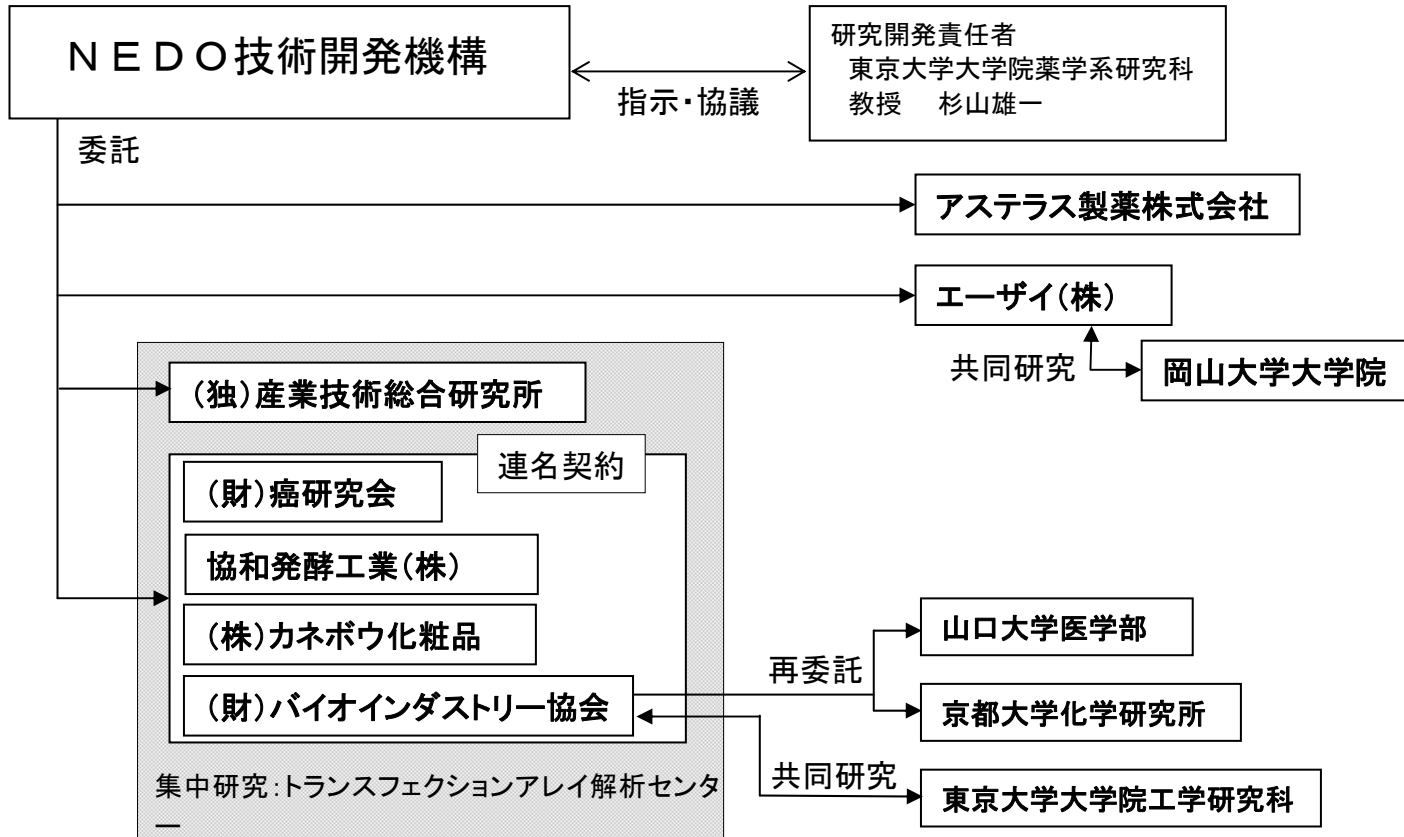
7. スケジュール

（1）本年度のスケジュール

- 平成19年7月： 外部有識者による研究開発の中間評価を実施する。
- 平成19年9月： 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。
- 平成20年2月： 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。

(別紙) 事業実施体制全体図

「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」実施体制



平成20年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心プログラム

(大項目) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発

(中項目) モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発

(小項目) 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間には大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的

とする。

(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用い、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。

(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。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施している。また、外部有識者を含めた研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

4. 1 平成19年度までの実施内容

(1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

平成17年度は乳ガン細胞を対象として遺伝子パスウェイ解析を行うための基盤技術の確立を行った。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/ティッシュエンジニアリング研究コンプレックス(RICE/Terc)では細胞チップ(トランスフェクションアレイ: TFA)を用いて1500種類以上の遺伝子に対する制御・解析技術と、顕微鏡画像から細胞の状態・パスウェイ制御の効果を自動的に判定するための情報処理方法を開発した。(財)癌研究会および協和発酵工業(株)のチームにおいては、臨床細胞を用いて得られた遺伝子データから統計解析を行い、50種類以上の候補遺伝子を絞り込んだ。また、患者のガン細胞と同じ遺伝子挙動を有し、培養可能・安定・

普遍的に遺伝子実験に用いることのできる細胞株（臨床モデル細胞）の樹立を進めた。産総研生物機能工学研究部門（BRF）と山口大学では、モデルガン細胞として8種類のATCC株化細胞を選び、CGH解析を進めた。産総研生命情報工学研究センター（CBRH）と京大のチームにおいては、TFAチップ上のヒト細胞の全自動画像解析システムを開発し、神経細胞の分化誘導などの系を用いて細胞の自動評価技術としての有効性を明らかにした。東京大学・長棟Gおよび鷺津Gにおいては、浮遊系細胞の固定化技術を評価し、最適化を行った。固定化された細胞にcDNAおよびsiRNAの導入を行うマイクロアレイを実現した。カネボウ化粧品においては、ヒト皮膚由来初代培養細胞7株を樹立すると共にDNA修復関連遺伝子から335遺伝子を選定した。

平成18年度は、①細胞への遺伝子導入技術に関しては、当該プロジェクトに供する各種株化ガン細胞、不死化正常細胞、正常乳腺上皮細胞、樹立細胞などへの高効率トランスフェクションのためのウェルベース固相系トランスフェクション法を開発した。その結果、導入が著しく困難だった皮膚由来初代培養細胞へのsiRNAの高効率導入に成功した。細胞アレイで解析対象の乳ガン培養細胞のゲノムレベルの異常についてBACアレイCGHにより詳細な解析を行い、新たな高頻度乳ガン特異的異常部位を見出した。これは遺伝子相関を解析する場合の基盤的情報として有用と考えられた。ガン関連遺伝子、創薬ターゲット遺伝子の絞込み技術の開発に関しては、TRAILとアポトーシス関連遺伝子に対するsiRNAを用いて88枚に及ぶ大量のTFAを用いてその影響を細胞の生存率を計算することにより調べ、遺伝子のピックアップを行った。また、細胞の転移能の評価を見据えた新規TFA技術（細胞運動評価チップ）を開発した。

浮遊系細胞用TFA技術の研究開発に関しては、BAM（生体膜アンカーリング試薬）修飾基板上にヒト白血病細胞株9種、ヒトカルシノーマ3種、ヒト末梢血単核球画分細胞などについては良好に固定化できること、また正常に増殖できる細胞種のあることを確認した。BAMを使った積層パターンニングにより、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞から成る複合型の血管モデルシートを作製し、さらにこのシートを基板上に固定化した転移性ガン細胞シートの上に重層し、がん細胞の組織浸潤性評価用TFAチップを作製することに成功するとともに、がん細胞への遺伝子導入に成功した。電界集中型マイクロエレクトロポレーション法を用いた蛍光タンパク質EGFP（27KDa）発現プラスミドの細胞内導入とその発現に成功した。

②時系列データの解析技術の開発に関しては、時系列データの取得を行い、一細胞系におけるデータ処理手法および特徴抽出方法の確立を行なった。すなわち、周期の異なる細胞を、コンピュータ上で同期させるとともに、周期非依存的な遺伝子変動を抽出する技術を確立し、時系列分析の基盤を確立できた。時系列分析ではデータが極端に増加するため、コンピュータによる自動分析、処理技術が必須となる。本プロジェクトでは、個別細胞の認識と自動追跡を行うために、20000枚の画像を8時間で処理できるようにシステムを構築した。また、巨大データ処理のためのデータストレージシステム(2

00TB容量)を整備した。さらに、遺伝子相関に関する自動化技術として確率ブーリアンネットワークを計算するアルゴリズムを開発した。

③ ガンなどの臨床細胞を用いての研究では、培養細胞株樹立について、倫理、細胞の入手・取り扱い、細胞株の樹立方法などの決定および保存システムの整備を行った。臨床細胞については分子生物学的特性(DNA一次構造およびRNA発現)を解析し、乳ガン培養細胞に適した樹立条件を確立するとともに、これまで56例の初代培養中10例を株化候補として抽出するに至った。ガン細胞に関する遺伝子発現プロファイリングによりパクリタキセル感受性を規定する106個の候補遺伝子を選び、テキストマイニングによるネットワーク解析を行ってその役割の評価を行うと共に、実験的にも重要な遺伝子についての絞込みを進めた。皮膚由来初代培養細胞(線維芽細胞、表皮細胞)の樹立については、健常人および光線過敏症患者各7名よりUV応答アレイデータの情報整備システムを構築し、皮膚由来初代培養細胞に対するsiRNAの導入条件を確立して遺伝子候補スクリーニングを進めた。

平成19年度は、①細胞への遺伝子導入技術に関しては、TFAの改良を行い、その結果TFAへ最適化した細胞株はアレイフォーマットで29種類、ウェルフォーマットで18種類となった。細胞時系列解析用「細胞運動性評価チップ」を用い、siRNAを導入し、時系列データを評価することにより、ガン浸潤の一因である運動にかかわる遺伝子のスクリーニングを行った。浮遊系細胞用TFA技術の研究開発を進め、電界集中型マイクロエレクトロポレーション法の様々な条件の改良を行い、更に導入した遺伝子の発現時期・発現量を制御するため、光分解性化合物で核酸を共有結合的に保護した「ケージド核酸」を作成し、細胞内に導入し光照射によって遺伝子発現を同期化する技術を開発した。

②時系列データの解析技術の開発に関しては、遺伝子発現の時期を同調化する技術を開発した。またTRAILシグナル下流で働く細胞死関連転写因子の活性化シグナル伝達カスケードをレポーター遺伝子発現システムとsiRNAによるシグナル伝達タンパク質の発現抑制システムを用い、数理的に解析する手法を開発した。

TFAで得られた大量の時系列データの解析のため、細胞画像の数値化及び自動化を行った。また遺伝子ネットワーク解析の実験計画を作り、ネットワーク動態解析の自動化技術を開発し、解析モデルの作成を行った。

③ガンなどの臨床細胞を用いての研究では、ガン細胞に関する遺伝子発現プロファイリングによりパクリタキセル感受性を規定する106個の候補遺伝子から、テキストマイニングによるネットワーク解析を行い、64遺伝子まで絞込みを終了した。またTRAIL感受性制御関連遺伝子をTFAで検索し、アポトーシス促進遺伝子14種類を絞り込みパスウェイ解析を行った。

以上、平成17～19年度において、TFAを用いた創薬支援に向けた遺伝子パスウェイ解析を本格的に行うために必要な、細胞株の樹立と評価、TFAの開発、TFAデ

一タ前処理技術、候補遺伝子の絞り込み技術等、基盤技術を確立した。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、財団法人バイオインダストリー協会、財団法人癌研究会、協和発酵工業株式会社、株式会社カネボウ化粧品（共同研究：東京大学、再委託：京都大学、山口大学）)

(2) リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

平成17年度は、高効率な遺伝子導入技術開発として、一般的な方法では導入困難とされた糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対する遺伝子導入方法をEGFP遺伝子を用いたFACS法により検討した結果、約70%の導入効率で遺伝子導入することが可能となり、プロジェクト推進のための基本技術開発を予定を早めて達成した。さらに、この技術を用いて、1つのキナーゼのサブユニットのドミナントネガティブcDNAを糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に導入可能とした。タンパク発現量から、80~90%の高い導入効率であると推定された。リン酸化アレイシステムによる遺伝子機能評価方法の開発においては、糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対して血糖降下剤を刺激として用いて、刺激による糖産生能変化を経時的変化として観測可能とした。

平成18年度は、平成17年度に開発した技術をsiRNAの導入に発展させた。蛍光標識オリゴ核酸を用いたFACSによる導入の最適化により90%以上の効率で導入可能とした。さらに、新規な化学構造を有する導入試薬Fを見出した。この導入技術により糖産生経路に深く関与するキナーゼPEPCKの発現抑制により糖産生が抑制されることを確認し、開発技術が細胞機能に関与する遺伝子の機能検証に応用可能であることを明らかとした。また、開発したsiRNAの導入と機能検証技術を活用することでメトフォルミン薬効に深く関与する膜タンパクXを見い出すと共にマウスキナーゼのsiRNAライブラリーを使った実効性検証を行い開発技術が広くsiRNAの機能検証に応用可能であることを明らかとした。さらには、メトフォルミン薬効のリン酸化マーカーをリン酸化アレイによるリン酸化プロファイリングにより見出し、その妥当性検証をモデル動物組織や細胞系での遺伝子発現プロファイル解析と平行して行っている。

平成19年度は新規な化学構造を有する導入試薬KG6を用いた「カルチャープレート型細胞アレイ」においてsiRNAを使った「loss-of-function」技術を確立し、この細胞の機能である糖産生能の変化量とメトフォルミン薬効の変化量を評価指標としたsiRNAの機能検証を可能とした。このことで、siRNAを用いた「loss-of-function」解析により糖産生経路の律速酵素であるPEPCKの機能検証を可能とするとともにメトフォルミン薬効カスケード上の重要分子であるXの機能検証を可能とした。この技術を応用することで細胞内リン酸化シグナルに関係するキナーゼとフォスファターゼのsiRNAセット（約3500配列）の機能評価を展開した。一方、「リン酸化アレイシステム」によりメトフォルミン薬効に強く関与

しているリン酸化シグナルをリン酸化プロファイリングにより見出した。妥当性検証を行った後、これを活用した機能評価技術の開発を進めた。

以上、平成17～19年度において、ラット肝臓由来培養細胞への高効率な遺伝子導入技術を開発し、それを siRNA の導入に発展させることで、「カルチャープレートを用いた細胞アレイ技術」及び「リン酸化アレイシステム」として創薬研究に応用可能な段階に達した。なお開発された技術の仕様は当初の目的の他に診断技術として、また新規導入試薬 KG6 は核酸医薬のキャリアーとしても有望である。

本研究は所期の目標を達成したため、平成19年度で終了する。

(実施体制：アステラス製薬株式会社)

(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

平成17年度は、各種細胞に対するタンパク質導入法によるタンパク質・遺伝子導入効率について、神経系、消化器系ならびに筋肉系細胞への導入効率を検討した。その結果、約80%の細胞種では50%以上の導入効率であった。また、未分化な細胞への導入効率が悪いことが明らかになった。さらに、細胞へのタンパク質・遺伝子導入効率を向上させるために、レーザー照射によるマクロピノソームリリーシング法の開発に着手し、繊維芽細胞・神経細胞に440nm波長のレーザーを照射することによりマクロピノソームに取り込まれたタンパク質を細胞内にリリーシングすることに成功した。また、神経系の培養細胞からルーチ的に数百種類のリン酸化ペプチドを同定する方法を確立し、その同定結果の精度についても検証を行った。引き続き細胞を刺激した際のリン酸化の変動についても実験を開始し、一度の実験で200種類前後のリン酸化ペプチドについて定量した。

平成18年度は、主に呼吸器、生殖器ならびに上皮系細胞株への蛋白質導入法による蛋白・遺伝子導入効率について検討した。計78種類の細胞株について検討した結果、約80%の細胞株において50%以上の導入効率を得られた。また、低毒性マクロピノソームからのリリーシングペプチドの開発を行い、蛋白質導入法の高機能化に成功した。また膜透過性ペプチドならびに RNA 結合蛋白質による新規 siRNA 導入技術開発を行い、培養細胞内の遺伝子をノックダウンすることができた。ヒトガン細胞からは344種類のリン酸化ペプチドを同定し、より精力的に行ったマウス神経由来の細胞 Neuro2aからは1700種類あまりのリン酸化ペプチドを同定し、マウスの脳からも既に1400種類あまりのリン酸化ペプチドを同定した。これらのうち幾つかを岡山大学にて機能解析を開始した。さらにハンチントン病原因遺伝子 H1p1 改変マウスの脳におけるリン酸化状態、発現タンパク質の変化について測定を開始した。タンパク質のカタログ化として、異なるヒト組織由来の癌細胞、Hep2 (肝癌)、HCT116 (大腸癌)、PC9 (肺癌)、MCF7 (乳癌)、DU145 (前立腺癌)、HEK293 (腎癌～測定

未完了) について検討を開始し、同定されたタンパク質の種類は各癌細胞とも 1 万種類以上であった。ちなみに DNA マイクロアレイにて HCT 116 で発現している遺伝子を調べたところ、約 3 分の 1 が発現しているという結果であった (約 9000 遺伝子中 2900 遺伝子)。発現しているタンパク質のセミ定量を試みた結果、組織が異なるにもかかわらず、約 9 割のタンパク質が共通していた。定量精度を高めるために合成ペプチド 300 種類を用意し、これらを内部標準ペプチドとして、LC/MS による定量測定を開始した。

平成 19 年度はエイズウイルスが発現する TAT ペプチドに RNA 結合蛋白質を付加した膜透過性蛋白質の開発を行った。この蛋白質と siRNA を試験管内で反応後、細胞培養液中に添加すると、siRNA が効率よく細胞内に導入された。初代神経細胞においても効率よく導入されることが明らかになった。また肝炎ウイルスが発現する Translocation domain ペプチドを蛋白質に付加することにより、マクロピノソームに取りこまれた蛋白質を細胞内に放出させる技術の開発にも成功した。

酸化タンパク質を濃縮する方法をプロトコール化し、その上で偽陽性を減らす方法を加えて、細胞内のリン酸化タンパク質を質量分析にて効率的に同定できる方法を開発した。マウス脳から 1900 種類余り、マウス神経由来の Neuro2a 細胞から 1700 種類余りのリン酸化タンパク質を同定した。

安定同位体標識した細胞を内部標準細胞として使用し、細胞に発現しているタンパク質のカタログ化をはかるために、500 種類のタンパク質に対して実際に質量分析で同定した実績のあるトリプシン消化ペプチド合成を行った。また並行してヒト由来の臓器が異なる 5 種類の癌細胞に発現している数千種類のタンパク質のセミ定量も行った。

以上、平成 17～19 年度において、各種培養細胞に高効率に外来 DNA、タンパク質を導入する技術、また取り込まれた DNA、タンパク質をレーザー照射により放出する技術等を確立した。また、細胞内リン酸化ペプチドをルーチンの同定する方法を確立し、約 3600 種の同定を行った。

当研究は所期の目的をほぼ達成したため、平成 19 年度で終了する。

(実施体制：エーザイ株式会社 (共同研究：岡山大学))

4. 2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移 (百万円) :	306	431	366		
一般会計					
特許出願件数 (件) :	0	2	3		
論文発表数 (報) :	6	31	40		
口頭発表、その他発表 (件) :	16	40	48		

5. 事業内容

(1) 平成20年度事業内容

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照。

細胞表現型と遺伝子機能の広範な相関ネットワークを解析するために、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と、その情報から創薬ターゲットが関わるパスウェイを解析するための時系列細胞情報解析技術の開発を行い、パスウェイ解析を利用した創薬ターゲット絞込み・同定への有用性を評価するための統合化したシステム (ターゲットバリデーションシステム) を構築する。これらの研究開発によって、創薬の基盤技術になりうる創薬ターゲット同定技術を開発する。

1. 細胞モニタリング技術開発

多数の変動遺伝子と細胞表現型の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や発現レポーター等を高効率で導入する技術、および与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術を開発する。具体的には、トランスフェクションアレイ等を用い、ガンなどの特定の疾患細胞をモデルとして、RNA干渉を用いた特定の遺伝子の機能抑制を行いながら、創薬ターゲット候補および関連遺伝子の発現の時系列データを取得し、遺伝子の挙動と細胞の表現型の関連を詳しくかつ広範に解析する。平成20年度は特に、ガン細胞種を適用拡張するために、浮遊系細胞などのトランスフェクションメカニズムを解析し、その機能を促進させる方法を開発し、乳ガン細胞やモーターレポーターを用いた一細胞時系列解析が可能になるようシステムを拡張する。

2. 細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性、さらに、その情報から疾患治療に効果的なパスウェイを解析する技術を開発する。対象となる遺伝子について無作為に網羅的な解析を行うものではないが、たとえ数個の遺伝子であってもその相関、時系列解析とその時の細胞の状態を画像で記録して解析を行おうとすると、巨大なデータの保存と加工、解析が必要となる。そのために、細胞画像データに基づくパスウェイ解析に適した情報処理技術の開発及び同様に巨大な量となる画像データとパスウェイの抽出などを自動的に行う技術を開発する。平成20年度は特に、遺伝子機能関連の動的ネットワーク解析に求められる精度の遺伝子変動データ取得法について検討するため、TRAIL等によって引き起こされる細胞内現象をモデルとして、細胞レベルの時間変動を反映した時系列データの取得ができるシステムの確立を目的とし、細胞周期同期化法を応用した一細胞時系列解析システムを開発する。

3. 創薬ターゲット同定技術開発

細胞モニタリング技術と細胞情報解析技術を活用して解析したパスウェイ情報に基づき、有望な創薬ターゲットを信頼性高く、高効率に絞り込むことを可能にする技術の開発

を行う。具体的には、実際の創薬に用いられる乳ガン臨床モデル細胞及び皮膚由来各種初代培養細胞を用いた創薬ターゲットの絞込み・同定をモデルとして、細胞アレイを活用した創薬ターゲットの同定技術の有効性を評価する。

さらに、上記創薬ターゲットの同定技術が適用できる細胞種については血球系などへ拡張することを目指す。平成20年度は特に、一細胞時系列計測から得られたTRAILに依存したアポトーシスに関連する遺伝子の動力的ネットワークの絞込みを行う。まず、統計的アプローチにより発現量変化パスウェイの推定による創薬ターゲットの大まかな絞込みを行い、さらに動力的アプローチによる発現量変化遺伝子の推定によって創薬ターゲット分子の絞込みを行う。推定されたパスウェイについて離散モデルに基づき解析及び検証を行う。

(2) 平成20年度事業規模

一般会計 241百万円（継続）

（注）事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の評価（中間評価及び事後評価）を行う。

平成19年7月に実施した中間評価結果を踏まえ、実施体制の一部変更を行う。

平成22年度に事後評価を行う。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を厳守し研究開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24製局第1号）を厳守する。

7. スケジュール

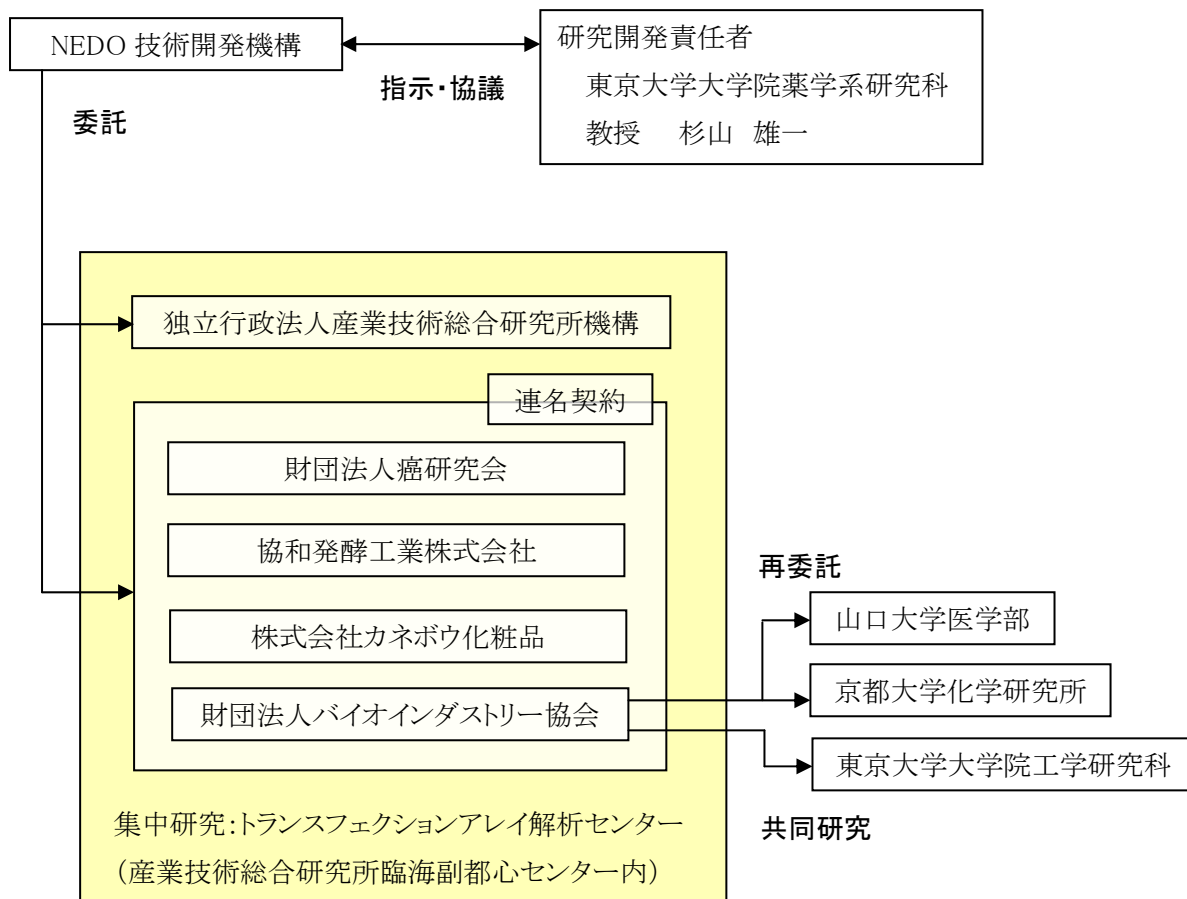
(1) 本年度のスケジュール

平成20年9月： 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。

平成21年2月： 研究推進委員会を開催し、外部委員による進捗評価を行う。

(別紙) 実施体制図

「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」



平成21年度実施方針

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：(プログラム名) 健康安心イノベーションプログラム
(大項目) ゲノム創薬加速化支援バイオ基盤技術開発
(中項目) モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発
(小項目) 細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第二号

3. 背景及び目的・目標

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。

これは、遺伝子機能と表現型の間には大きな溝があることに起因しており、これらの相互関係を推定する技術の開発が望まれている。このためには、生命の最小単位である細胞に着目し、細胞に様々な刺激を与えた結果として得られる細胞応答の時間的な変動データを利用して、これまでに得られている様々な情報を細胞のレベルで統合し、情報伝達の動的ネットワーク構造として示すことによって、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ハイスループットに行うことを可能とすることが重要である。

本研究開発は、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疾患関連遺伝子等、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ことを目的

とする。

(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用い、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。

(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、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。

4. 実施内容及び進捗（達成）状況

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施している。また、外部有識者を含めた研究開発推進委員会を半期に一度の割合で開催し、研究開発目的・目標と照らし合わせながら、研究進捗の確認をおこなった。

4. 1 平成20年度までの事業内容

(1) トランスフェクションアレイを用いた遺伝子機能の解析技術の開発

平成17年度は乳ガン細胞を対象として遺伝子パスウェイ解析を行うための基盤技術の確立を行った。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/ティッシュエンジニアリング研究コンプレックス(RICE/Terc)では細胞チップ（トランスフェクションアレイ：TFA）を用いて1500種類以上の遺伝子に対する制御・解析技術と、顕微鏡画像から細胞の状態・パスウェイ制御の効果を自動的に判定するための情報処理方法を開発した。癌研および協和発酵のチームにおいては、臨床細胞を用いて得られた遺伝子データから統計解析を行い、50種類以上の候補遺伝子を絞り込んだ。また、患者のガン細胞と同じ遺伝子挙動を有し、培養可能・安定・普遍的に遺伝子

実験に用いることのできる細胞株（臨床モデル細胞）の樹立を進めた。産総研生物機能工学研究部門（BRF）と山口大では、モデルガン細胞として8種類のATCC株化細胞を選び、CGH解析を進めた。産総研生命情報工学研究センター（CBRC）と京大のチームにおいては、TFAチップ上のヒト細胞の全自動画像解析システムを開発し、神経細胞の分化誘導などの系を用いて細胞の自動評価技術としての有効性を明らかにした。東大・長棟Gおよび鷺津Gにおいては、浮遊系細胞の固定化技術を評価し、最適化を行った。固定化された細胞にcDNAおよびsiRNAの導入を行うマイクロアレイを実現した。カネボウ化粧品においては、ヒト皮膚由来初代培養細胞7株を樹立すると共にDNA修復関連遺伝子から335遺伝子を選定した。

平成18年度は、(ア)細胞への遺伝子導入技術に関しては、当該プロジェクトに供する各種株化ガン細胞、不死化正常細胞、正常乳腺上皮細胞、樹立細胞などへの高効率トランスフェクションのためのウェルベース固相系トランスフェクション法を開発した。その結果、導入が著しく困難だった皮膚由来初代培養細胞へのsiRNAの高効率導入に成功した。細胞アレイで解析対象の乳ガン培養細胞のゲノムレベルの異常についてBACアレイCGHにより詳細な解析を行い、新たな高頻度乳ガン特異的異常部位を見出した。これは遺伝子相関を解析する場合の基盤的情報として有用と考えられた。ガン関連遺伝子、創薬ターゲット遺伝子の絞込み技術の開発に関しては、TRAILとアポトーシス関連遺伝子に対するsiRNAを用いて88枚に及ぶ大量のTFAを用いてその影響を細胞の生存率を計算することにより調べ、遺伝子のピックアップを行った。また、細胞の転移能の評価を見据えた新規TFA技術（細胞運動評価チップ）を開発した。

浮遊系細胞用TFA技術の研究開発に関しては、BAM（生体膜アンカーリング試薬）修飾基板上にヒト白血病細胞株9種、ヒトカルシノーマ3種、ヒト末梢血単核球画分細胞などについては良好に固定化できること、また正常に増殖できる細胞種のあることを確認した。BAMを使った積層パターンニングにより、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞から成る複合型の血管モデルシートを作製し、さらにこのシートを基板上に固定化した転移性ガン細胞シートの上に重層し、がん細胞の組織浸潤性評価用TFAチップを作製することに成功するとともに、がん細胞への遺伝子導入に成功した。電界集中型マイクロエレクトロポレーション法を用いた蛍光タンパク質EGFP（27KD）発現プラスミドの細胞内導入とその発現に成功した。

(イ)時系列データの解析技術の開発に関しては、時系列データの取得を行い、一細胞系におけるデータ処理手法および特徴抽出方法の確立を行なった。すなわち、周期の異なる細胞を、コンピュータ上で同期させるとともに、周期非依存的な遺伝子変動を抽出する技術を確立し、時系列分析の基盤を確立できた。時系列分析ではデータが極端に増加するため、コンピュータによる自動分析、処理技術が必須となる。本プロジェクトでは、個別細胞の認識と自動追跡を行うために、20000枚の画像を8時間で処理できるようにシステムを構築した。また、巨大データ処理のためのデータストレージシス

テム(200TB容量)を整備した。さらに、遺伝子相関に関する自動化技術として確率ブーリアンネットワークを計算するアルゴリズムを開発した。

(ウ) ガンなどの臨床細胞を用いての研究では、培養細胞株樹立について、倫理、細胞の入手・取り扱い、細胞株の樹立方法などの決定および保存システムの整備を行った。臨床細胞については分子生物学的特性(DNA一次構造およびRNA発現)を解析し、乳ガン培養細胞に適した樹立条件を確立するとともに、これまで56例の初代培養中10例を株化候補として抽出するに至った。ガン細胞に関する遺伝子発現プロファイリングによりパクリタキセル感受性を規定する106個の候補遺伝子を選び、テキストマイニングによるネットワーク解析を行ってその役割の評価を行うと共に、実験的にも重要な遺伝子についての絞込みを進めた。皮膚由来初代培養細胞(線維芽細胞、表皮細胞)の樹立については、健常人および光線過敏症患者各7名よりUV応答アレイデータの情報整備システムを構築し、皮膚由来初代培養細胞に対するsiRNAの導入条件を確立して遺伝子候補スクリーニングを進めた。

平成19年度は、(ア) 細胞への遺伝子導入技術に関しては、TFAの改良を行い、その結果TFAへ最適化した細胞株はアレイフォーマットで29種類、ウェルフォーマットで18種類となった。細胞時系列解析用「細胞運動性評価チップ」を用い、siRNAを導入し、時系列データを評価することにより、ガン浸潤の一因である運動にかかわる遺伝子のスクリーニングを行った。浮遊系細胞用TFA技術の研究開発を進め、電界集中型マイクロエレクトロポレーション法の様々な条件の改良を行い、更に導入した遺伝子の発現時期・発現量を制御するため、光分解性化合物で核酸を共有結合的に保護した「ケージド核酸」を作成し、細胞内に導入し光照射によって遺伝子発現を同期化する技術を開発した。

(イ) 時系列データの解析技術の開発に関しては、遺伝子発現の時期を同調化する技術を開発した。またTRAILシグナル下流で働く細胞死関連転写因子の活性化シグナル伝達カスケードをレポータ遺伝子発現システムとsiRNAによるシグナル伝達タンパク質の発現抑制システムを用い、数理的に解析する手法を開発した。

TFAで得られた大量の時系列データの解析のため、細胞画像の数値化及び自動化を行った。また遺伝子ネットワーク解析の実験計画を作り、ネットワーク動態解析の自動化技術を開発し、解析モデルの作成を行った。

(ウ) ガンなどの臨床細胞を用いての研究では、ガン細胞に関する遺伝子発現プロファイリングによりパクリタキセル感受性を規定する106個の候補遺伝子から、テキストマイニングによるネットワーク解析を行い、64遺伝子まで絞込みを終了した。またTRAIL感受性制御関連遺伝子をTFAで検索し、アポトーシス促進遺伝子14種類を絞り込みパスウェイ解析を行った。

平成20年度は、(ア) TRAILによる細胞死のプロセスをモデルとして、遺伝子転写制御を指標に細胞状態をモニターするためのツールが開発でき、TFAサイクルによ

って絞り込まれた遺伝子の機能を評価できるようになった。浮遊系細胞用 T F A 技術の研究開発を進め、電界集中型マイクロエレクトロポレーションの効率向上に成功し、浮遊系細胞を対象とした大規模解析手法への応用可能性が示された。また、遺伝子発現時期・発現量をより微弱な光によって制御できる「ケージド核酸」の合成を進め、光照射によって遺伝子発現を行う化学的基礎を確立した。

(イ) 外来タンパク質発現と細胞分裂のタイミング相関性を応用することにより遺伝子デリバリー材料の核移行性を評価する新しい手法を開発した。またレポータ遺伝子発現システムと s i R N A によるシグナル伝達タンパク質の発現抑制システムを用い、T R A I L シグナル下流で働く細胞死関連転写因子の活性化シグナル伝達カスケードを数理的に解析する手法を開発した。G F P などの発現細胞の光量が想定値より低いことが判明したために、1細胞・時系列データの解析のための細胞画像の数値的処理のためのシステムを状態に合わせて構築した。

(ウ) T F A サイクルによって紫外線感受性やパクリタキセル感受性に関わる遺伝子群を絞り込んだ結果、全ゲノムから特定の遺伝子群が絞り込まれることが確認され、T F A サイクルの有効性が示された。

以上、平成17～20年度において、T F A を用いた創薬支援に向けた遺伝子パスウェイ解析を本格的に行うために必要な、細胞株の樹立と評価、T F A の改良、T F A データ前処理技術、候補遺伝子の絞り込み技術等、基盤技術を確立した。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、財団法人バイオインダストリー協会、財団法人癌研究会、協和発酵キリン株式会社、株式会社カネボウ化粧品（共同実施：東京大学、再委託：京都大学、山口大学）)

(2) リン酸化アレイを用いた遺伝子機能解析技術の開発

平成17年度は、高効率な遺伝子導入技術開発として、一般的な方法では導入困難とされた糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対する遺伝子導入方法を E G F P 遺伝子を用いた F A C S 法により検討した結果、約70%の導入効率で遺伝子導入することが可能となり、プロジェクト推進のための基本技術開発を予定を早めて達成した。さらに、この技術を用いて、1つのキナーゼのサブユニットのドミナントネガティブ c D N A を糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に導入可能とした。タンパク発現量から、80～90%の高い導入効率であると推定された。リン酸化アレイシステムによる遺伝子機能評価方法の開発においては、糖産生機能を有する肝臓由来の培養細胞株に対して血糖降下剤を刺激として用いて、刺激による糖産生能変化を経時的変化として観測可能とした。

平成18年度は、平成17年度に開発した技術を s i R N A の導入に発展させた。蛍光標識オリゴ核酸を用いた F A C S による導入の最適化により90%以上の効率で導入可能とした。さらに、新規な化学構造を有する導入試薬 F を見出した。この導入技術に

より糖産生経路に深く関与するキナーゼPEPCKの発現抑制により糖産生が抑制されることを確認し、開発技術が細胞機能に関与する遺伝子の機能検証に応用可能であることを明らかとした。また、開発したsiRNAの導入と機能検証技術を活用することでメトフォルミン薬効に深く関与する膜タンパクXを見いだすと共にマウスキナーゼのsiRNAライブラリーを使った実効性検証を行い開発技術が広くsiRNAの機能検証に応用可能であることを明らかとした。さらには、メトフォルミン薬効のリン酸化マーカーをリン酸化アレイによるリン酸化プロファイリングにより見出し、その妥当性検証をモデル動物組織や細胞系での遺伝子発現プロファイル解析と平行して行っている。

平成19年度は新規な化学構造を有する導入試薬KG6を用いた「カルチャープレート型細胞アレイ」においてsiRNAを使った「loss-of-function」技術を確立し、この細胞の機能である糖産生能の変化量とメトフォルミン薬効の変化量を評価指標としたsiRNAの機能検証を可能とした。このことで、siRNAを用いた「loss-of-function」解析により糖産生経路の律速酵素であるPEPCKの機能検証を可能とするとともにメトフォルミン薬効カスケード上の重要分子であるXの機能検証を可能とした。この技術を応用することで細胞内リン酸化シグナルに関係するキナーゼとフォスファターゼのsiRNAセット（約3500配列）の機能評価を展開した。一方、「リン酸化アレイシステム」によりメトフォルミン薬効に強く関与しているリン酸化シグナルをリン酸化プロファイリングにより見出した。妥当性検証を行った後、これを活用した機能評価技術の開発を進めた。

以上、平成17～19年度において、ラット肝臓由来培養細胞への高効率な遺伝子導入技術を開発し、それをsiRNAの導入に発展させることで、「カルチャープレートを用いた細胞アレイ技術」及び「リン酸化アレイシステム」として創薬研究に応用可能な段階に達した。なお開発された技術の仕様は当初の目的の他に診断技術として、また新規導入試薬KG6は核酸医薬のキャリアーとしても有望である。

本研究は所期の目標を達成したため、平成19年度で終了した。

(実施体制：アステラス製薬株式会社)

(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

平成17年度は、各種細胞に対するタンパク質導入法によるタンパク質・遺伝子導入効率について、神経系、消化器系ならびに筋肉系細胞への導入効率を検討した。その結果、約80%の細胞種では50%以上の導入効率であった。また、未分化な細胞への導入効率が悪いことが明らかになった。さらに、細胞へのタンパク質・遺伝子導入効率を向上させるために、レーザー照射によるマクロピノソームリリーシング法の開発に着手し、繊維芽細胞・神経細胞に440nm波長のレーザーを照射することによりマクロピノソームに取り込まれたタンパク質を細胞内にリリーシングすることに成功した。また、

神経系の培養細胞からルーチン的に数百種類のリン酸化ペプチドを同定する方法を確立し、その同定結果の精度についても検証を行った。引き続き細胞を刺激した際のリン酸化の変動についても実験を開始し、一度の実験で200種類前後のリン酸化ペプチドについて定量した。

平成18年度は、主に呼吸器、生殖器ならびに上皮系細胞株への蛋白質導入法による蛋白・遺伝子導入効率について検討した。計78種類の細胞株について検討した結果、約80%の細胞株において50%以上の導入効率を得られた。また、低毒性マクロピノソームからのリリーシングペプチドの開発を行い、蛋白質導入法の高機能化に成功した。また膜透過性ペプチドならびにRNA結合蛋白質による新規siRNA導入技術開発を行い、培養細胞内の遺伝子をノックダウンすることができた。ヒトガン細胞からは344種類のリン酸化ペプチドを同定し、より精力的に行ったマウス神経由来の細胞Neuro2aからは1700種類あまりのリン酸化ペプチドを同定し、マウスの脳からも既に1400種類あまりのリン酸化ペプチドを同定した。これらのうち幾つかを岡山大学にて機能解析を開始した。さらにハンチントン病原因遺伝子H1p1改変マウスの脳におけるリン酸化状態、発現タンパク質の変化について測定を開始した。タンパク質のカタログ化として、異なるヒト組織由来の癌細胞、Hep2（肝癌）、HCT116（大腸癌）、PC9（肺癌）、MCF7（乳癌）、DU145（前立腺癌）、HEK293（腎癌～測定未完了）について検討を開始し、同定されたタンパク質の種類は各癌細胞とも1万種類以上であった。ちなみにDNAマイクロアレイにてHCT116で発現している遺伝子を調べたところ、約3分の1が発現しているという結果であった（約9000遺伝子中2900遺伝子）。発現しているタンパク質のセミ定量を試みた結果、組織が異なるにもかかわらず、約9割のタンパク質が共通していた。定量精度を高めるために合成ペプチド300種類を用意し、これらを内部標準ペプチドとして、LC/MSによる定量測定を開始した。

平成19年度はエイズウイルスが発現するTATペプチドにRNA結合蛋白質を付加した膜透過性蛋白質の開発を行った。この蛋白質とsiRNAを試験管内で反応後、細胞培養液中に添加すると、siRNAが効率よく細胞内に導入された。初代神経細胞においても効率よく導入されることが明らかになった。また肝炎ウイルスが発現するTranslocation domainペプチドを蛋白質に付加することにより、マクロピノソームに取りこまれた蛋白質を細胞内に放出させる技術の開発にも成功した。

酸化タンパク質を濃縮する方法をプロトコール化し、その上で偽陽性を減らす方法を加えて、細胞内のリン酸化タンパク質を質量分析にて効率的に同定できる方法を開発した。マウス脳から1900種類余り、マウス神経由来のNeuro2a細胞から1700種類余りのリン酸化タンパク質を同定した。

安定同位体標識した細胞を内部標準細胞として使用し、細胞に発現しているタンパク質のカタログ化をはかるために、500種類のタンパク質に対して実際に質量分析で同

定した実績のあるトリプシン消化ペプチド合成を行った。また並行してヒト由来の臓器が異なる5種類の癌細胞に発現している数千種類のタンパク質のセミ定量も行った。

以上、平成17～19年度において、各種培養細胞に高効率に外来DNA、タンパク質を導入する技術、また取り込まれたDNA、タンパク質をレーザー照射により放出する技術等を確立した。また、細胞内リン酸化ペプチドをルーチンの同定する方法を確立し、約3600種の同定を行った。

当研究は所期の目的をほぼ達成したため、平成19年度で終了した。

(実施体制：エーザイ株式会社（共同実施：岡山大学）)

4. 2 実績推移

	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度
実績額推移 一般勘定（百万円）	306	431	366	246	
特許出願件数（件）：	0	2	3	0	
論文発表数（報）：	6	31	40	34	
口頭発表、その他発表（件）：	16	40	48	81	

5. 事業内容

5. 1 平成21年度事業内容

東京大学大学院薬学研究科教授 杉山雄一氏をプロジェクトリーダーとして、以下の研究開発を実施する。実施体制については、別紙を参照。

細胞表現型と遺伝子機能の広範な関連ネットワークを解析するために、細胞一つ一つにおける遺伝子発現などを精密に解析することのできる時系列細胞モニタリング技術と、時系列データから創薬ターゲットが関わるパスウェイを解析するための時系列細胞情報解析技術の開発を行い、細胞機能と遺伝子機能の相関性に基づく創薬ターゲット絞込み・同定のための統合化したシステムを構築する。これらの研究開発によって、創薬の基盤技術になりうるターゲット同定技術を開発する。

(1) 細胞モニタリング技術開発

多数の変動遺伝子と細胞表現型の相互関係を解析するため、特定の遺伝子発現に対応する発現レポーター、想定されるパスウェイにかかわるRNA干渉などの手法等を用い、与えた刺激に対して細胞が示す反応の精密時系列計測を行う技術を開発する。具体的には、ガンなどの特定の疾患細胞をモデルとして、特定の遺伝子の機能の解析を行いながら、創薬ターゲット候補および関連遺伝子の発現の時系列データを取得し、遺伝子の挙動と細胞の表現型の関連を詳細に解析する。平成21年度は20年度に開発した遺伝子発現の解析技術など応用することにより、精密な一細胞時系列計測を対象細胞で行い、技術の評価を行

う。

(2) 細胞情報解析技術開発

遺伝子発現状況や細胞の表現系の変化など、細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性、さらに、その情報から疾患治療に効果的なパスウェイを解析する技術を開発する。対象となる遺伝子について無作為に網羅的な解析を行うものではないが、たとえ数個の遺伝子であってもその相関、時系列解析とその時の細胞の状態を画像で記録して解析を行おうとすると、巨大なデータの保存と加工、解析が必要となる。そのために、細胞画像データに基づくパスウェイ解析に適した情報処理技術の開発及び同様に巨大な量となる画像データとパスウェイの抽出などを自動的に行う技術を開発する。開発された画像解析技術、時系列解析技術について適用性、有用性を評価する。

(3) 創薬ターゲット同定技術開発

細胞モニタリング技術と細胞情報解析技術を活用して解析した遺伝子発現情報に基づき、有望な創薬ターゲットを信頼性高く、高効率に絞り込むことを可能にする技術の開発を行う。平成21年度は、開発した諸技術を統合して、実際の創薬に用いられる乳ガン臨床モデル細胞及び皮膚由来各種初代培養細胞等を用いたターゲット候補遺伝子の絞り込み・同定を行い、かかる遺伝子の探索・解析技術を評価する。

5. 2 平成21年度事業規模

委託事業

一般勘定 252百万円（継続）

（注）事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

(1) 評価の方法

NEDO技術開発機構は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来の産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の評価（中間評価及び事後評価）を行う。

平成19年7月に実施した中間評価結果を踏まえ、実施体制の一部変更を行った。

平成22年度に事後評価を行う予定である。

(2) 運営・管理

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を厳守し研究

開発を推進する。また、本研究開発成果の事業化においては、「経済産業分野のうち個人情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」（平成16・12・24製局第1号）を厳守する。

(3) 複数年度契約の実施

平成20～21年度の複数年度契約を行う。

7. スケジュール

平成21年7月・・・研究推進委員会開催。

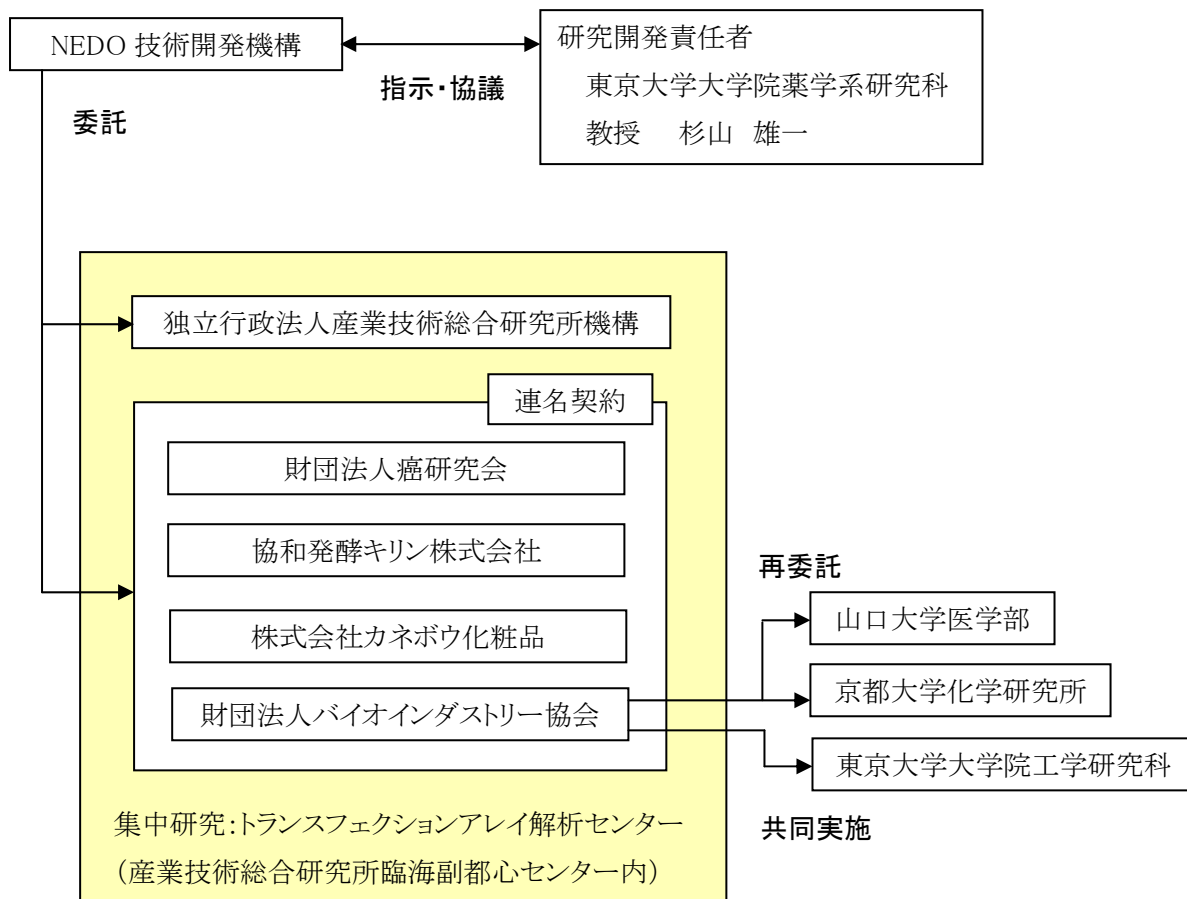
平成22年1月・・・研究推進委員会開催。

8. 実施方針の改定履歴

(1) 3月5日、制定。

(別紙) 実施体制図

「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」



創薬・診断分野

健康寿命の延伸、QOL（Quality of Life：生活の質）の向上は世界全体の願いであり、特に、今後、少子高齢化が他国に先駆けて進行する日本にとっては、喫緊の課題である。このために創薬・診断分野では、①「疾患の早期診断」、「適切な治療法の提供」によって、より良い医療サービスを提供していくとともに、②「予防医療による健康維持増進」によって、治療から予防へと転換し、より個人に適切に対応する「個の医療」を実現することを目指す。また、これらの手段の進展に伴い、健康産業のプレーヤー及び市場の拡大が見込まれる。

創薬・診断分野の目標実現に向けた各般の取組みを進めるため、導入シナリオ、技術マップ、技術ロードマップからなる技術戦略マップを策定する。導入シナリオは関連施策を含む、当該分野の全体像をまとめたものであり、技術マップ、技術ロードマップは以下に示す技術の観点から策定されている。

- ・ 治療にあたっての医薬品開発、疾患の早期発見及び個人の遺伝情報等に合わせた医薬品の投与を可能とする診断技術
- ・ 医療関連分野において共通基盤となるポストゲノム研究に係る知見・技術

また、技術戦略マップの策定にあたっては、医薬品の開発・上市には長期間を要することを踏まえて、今後 20 年間程度を見据えたものとする。

創薬・診断分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

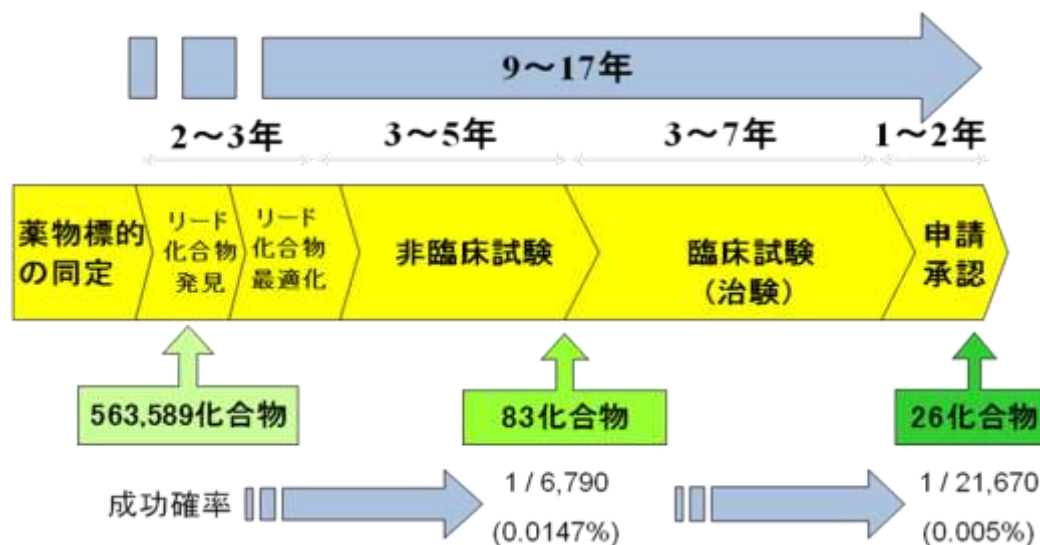
(1) 創薬・診断分野の目標と将来実現する社会像

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を実現することは、喫緊の課題である。そのために創薬・診断分野が果たす役割は大きい。具体的には、①疾患を予防することによる健康維持増進、②疾患の早期診断・早期治療による迅速な社会復帰、③適切な治療法の提供による個々の医療の実現を通じて健康寿命の延伸、QOLの向上を図るとともに、本分野における関連産業の国際競争力強化を目指す。

(2) 研究開発の取組み

現在の創薬プロセスにおいては、1つの医薬品が製品化されるまでに9～17年程度の期間及び500億円を超える開発費が必要であるといわれている。研究開発費のうちの7割強は臨床試験までに投入されている。

図1 新薬開発の特質 (03年～07年の例)



出典：てきすとぶっく 製薬産業 2009

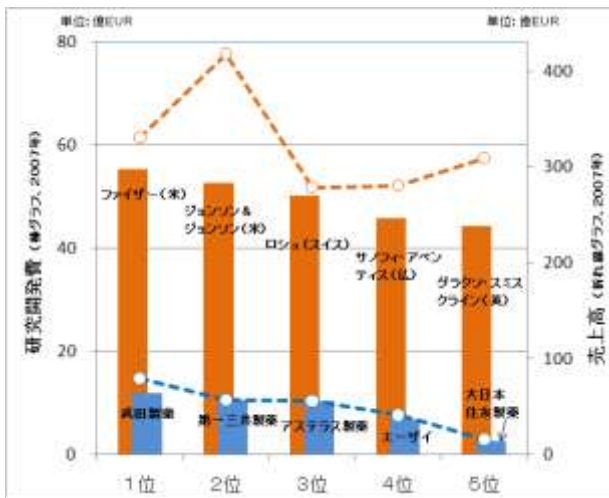
また、臨床試験開始後の成功確立が減少傾向にあることから、製薬企業における研究開発費の総額は増大し、創薬におけるR&Dリスクはますます高まる傾向にある。

我が国の企業の研究開発投資は、欧米と比べると規模で劣る。例えば全世界・日本の製薬企業の研究開発投資トップ5社を比べると、研究開発費・売上高ともに、規模の格差が顕著である。また、政府の研究開発規模も10倍近くの差がある。

一方で、このような状況下、売上高は必ずしも多くないが、医薬品の世界売り上げランキング50位以内に日本オリジンの医薬品が9品目入っており、差別化された領域

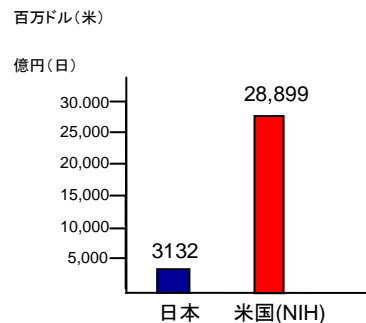
での強みが伺われる。

図2：全世界・日本の製薬企業トップ5社の比較



(出典) European Commission The 2008 EU Industrial R&D Investment Scoreboard より経済産業省

図3：政府における研究開発費の日米比較(2007年)



(出典) NIHホームページ、総合科学技術会議ライフサイエンスPTより経済産業省作成

また、バイオベンチャーは他分野ベンチャー企業以上に重要な役割を担うところであるが、企業数、ベンチャーキャピタルからの投資額、開発起源企業別にみたバイオ医薬品数において我が国のバイオベンチャーは、欧米との比較において未成熟といえる。

このため、我が国が少ない研究開発費で効率的な創薬を達成し、国際競争力を高めていくためには、基礎研究の成果を迅速に臨床に橋渡ししていくことを含め、産業界のニーズや我が国の強みを踏まえつつ、創薬プロセスにおける初期段階で成功率を高める研究開発に政府予算を投資していくことが重要である。

このような状況の中、経済産業省においては、ポストゲノム研究等により進展してきている遺伝子やタンパク質、糖鎖、RNA等の生体分子の機能・構造・ネットワーク解析やそれら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、成果を高度に活用するためのデータベース整備等を行うことにより、個々人に適切に対応した医療、予防医療の実現や画期的な新薬の開発、健康維持・増進に係る新しい産業の創出に係る取組を行ってきたところである。また、文部科学省、厚生労働省、経済産業省における創薬分野の関連予算を俯瞰した図を【参考資料 1：平成 20 年度→21 年度医薬品研究俯瞰図】に示す。

また、日本製薬工業会が「革新的創薬等のための官民対話」において平成21年度重点化施策として「安全性バイオマーカー」や「疾患の進行度や治療効果の度合いを示すバイオマーカーの探索」を基礎研究領域として提言しているように、これまでのプロジェクト等により定量・同定されたバイオマーカーデータの生物学的意味づけと検証が今後重要となってくることがうかがえる。

(3) 関連施策の取組み

創薬・診断分野における将来像を実現するためには、研究開発のみならず、開発の迅速化や成果普及につながる制度整備、標準化等の関連施策を一体的に推進する必要がある。このため、政府関係機関において以下の取組がなされている。

[起業・事業支援]

- ・ バイオベンチャーの抱える諸問題に対し、「革新的創薬等のための官民対話」ベンチャーWG等の場を通じた取組。
- ・ 「産業クラスター計画」に基づき、全国のバイオクラスターにおいて、企業間のネットワーク形成の支援、産学連携による研究開発プロジェクトの支援、地域系ベンチャーファンドによる資金調達支援等の実施。

[導入補助・支援]

- ・ 個人遺伝情報保護ガイドラインの適切な運用
- ・ バイオインダストリー安全対策調査の実施
- ・ バイオ事業化に伴う生命倫理問題等に関する研究の実施

[ガイドライン整備]

- ・ 検体の品質管理マニュアル(JCCLS)、テーラーメイド医療用診断機器(DNAチップ)ガイドラインの積極的活用。
- ・ 「分子遺伝学的検査における精度保証に関するガイドライン」(OECD)に準拠した日本版ガイドラインの策定と積極的活用。

[規制・制度改革・他省庁との連携]

- ・ 総合科学技術会議が推進するライフサイエンスPT、革新的技術戦略、社会還元プロジェクト、iPS(induced pluripotent stem cell)細胞研究WGの下での関係府省間における適切な連携の実施。
- ・ 内閣府、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の間で2009年2月に改訂した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」に基づき、研究資金の集中投入、ベンチャー企業の育成、臨床研究・治験環境の整備、アジアとの連携、薬事法における審査の迅速化・質の向上、イノベーションの適切な評価など、本分野における研究から上市に至る過程の一貫かつ集中的な支援の実施。【参考資料2-1：革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要】
- ・ 「革新的創薬等のための官民対話」の場を通じ、医薬品分野のイノベーション創出と産業の国際競争力強化に係る諸施策の方向性に対する製薬業界、教育・研究機関、行政(内閣府、文部科学省、厚生労働省、経済産業省)のトップの認識の共有化。
- ・ 2008年7月22日に設置された「健康研究推進会議」による、先端医療開発特区(スーパー特区)制度の推進と各省が実施している臨床研究や橋渡し研究を一体的に運用していくための司令塔機能の発揮。【参考資料2-2：平成21年度健康研究関係施策額】

〔基準・標準化〕

- ・ バイオチップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化活動の推進。

〔知的基盤整備〕

- ・ 研究開発の企画段階から研究テーマ周辺の論文及び特許状況のサーベイ実施や研究開発の実施段階における特許出願後の事業化構想等、特許に関する戦略的取組の実施をサポート。

〔特許化〕

- ・ 特許庁は、2008年10月より現行の早期審査よりも更に早期に審査を行う「スーパー早期審査制度」を創設、早期の事業化を目指す発明やライフサイクルが短い発明への早期審査のニーズを充足させるべく制度を構築。

（４）海外での取組み

米国では、NIHにおける約3兆円の研究開発予算のうち、83%が大学や病院といった外部研究に充当され、10%がNIH クリニカルセンターなどの内部研究に充てられている。また、NIHにおける生物医療学研究を推進するため、NIHに属する27研究所全体として取り組むべき研究分野を見極めることを目的にNIHロードマップを2003年9月に作成している。

NIHロードマップでは以下の主要テーマについて取組が行われている。

①New Pathways to Discovery :

生体メカニズムの理解を主眼とした細胞や組織を構成する生体分子のネットワーク、分子イメージング、構造生物学、バイオインフォマティクス、ナノ医療等に係る研究開発。

②Research Team of the Future

専門分野を越えた学際的研究を行うチーム、新しい組織モデルの検討。

③Re-Engineering the Clinical Research Enterprise

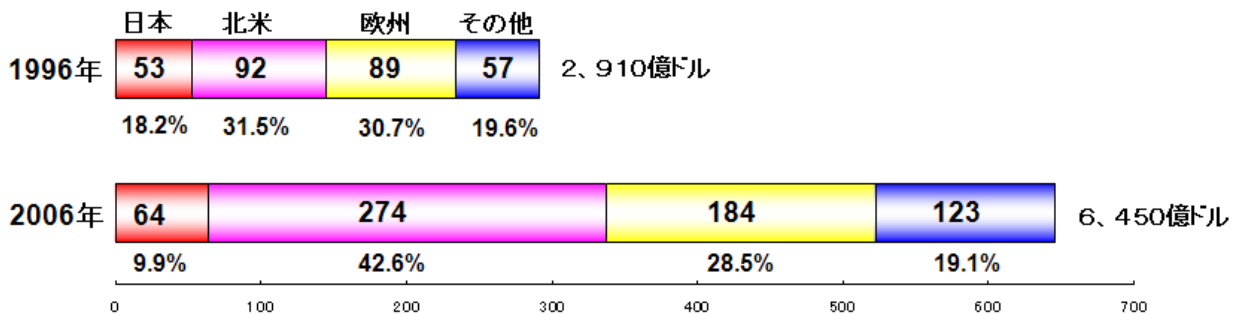
研究上の発見や諸成果を迅速に臨床現場に展開するためのシステム構築。

欧州では、科学技術に関する総合的なプログラム（Framework Programme）を3～4年単位で実施している。2006年12月には2007年～2013年の取組を示したFP7が策定・開始されている。FP7においては欧州レベルでの官民パートナーシップを実現化する新たな手法として共同研究イニシアチブが取り組まれており、6領域のイニシアチブの1つとして「革新的医薬品イニシアチブ」が展開されている。当該イニシアチブではアンメットメディカルニーズを含む医療領域に研究成果の迅速な橋渡しを促進する仕組みを構築することを狙いとしている。

（５）民間での取組み

過去10年で世界の医薬品市場はおおよそ倍近く拡大しているが、日本市場の伸びは2割程度にとどまり、結果として日本が占める割合は半減している。

図 4 世界の医薬品市場の推移



出典：「革新的創薬等のための官民対話」資料（IMS Health, IMS World Review 1998 2007）

こうした中、経営基盤の強化を図るため、企業間の再編や外部リソースの活用が進んでいる。

表 1：近年の再編動向（国内）

統合年	主たる企業名
2005年	・アステラス製薬（山之内製薬、藤沢薬品工業） ・大日本住友製薬（大日本製薬、住友製薬）
2007年	・第一三共（三共、第一製薬） ・田辺三菱製薬（田辺製薬、三菱ウェルファーマ）
2008年	・協和発酵キリン（協和発酵、キリンファーマ）

外部リソースの活用は経営基盤の強化を図ることに止まらず、企業にとってこれまで研究が立ち後れていた有用技術の早期導入に役立っているケースもあり、技術が国境を越える一つの契機にもなっている。

また、主要薬が相次いで特許切れになる「2010年問題」を見据え、米国企業を中心とした大規模な買収・合併の動きが加速していることも、今後の企業における研究開発に影響を与えることが予想される。

表 2：国境を越えた組織再編・技術提携

公表時期	内容
2008年5月	武田薬品工業がミレニアム・ファーマシューティカルズ社（米）を88億ドルで買収
2008年9月	ベーリンガーインゲルハイム（独）と北海道大学発ベンチャー、イーベックが5,500万ユーロで抗体作成技術のライセンス契約を締結
2009年1月	ファイザー（米）がワイス（米）を680億ドルで買収
2009年3月	メルク（米）がシェリング・プラウ（米）を411億ドルで買収
2009年3月	ロシュ（スイス）がジェネンティック（米）を468億ドルで買収

なお、iPS細胞研究をめぐる新しい動きとして、2008年7月に、京都大学をはじめ

とする iPS 細胞研究成果の産業界への円滑な移転を促進するため、「有限責任中間法人 iPS ホールディングス」が京都大学及び金融機関 3 社により設立された。

このほか、日本製薬工業会において、2008 年 11 月から活動期間 1 年として、iPS 細胞関連技術を研究する大学など各研究機関の知財戦略構築・遂行を支援するプロジェクトを開始している。

診断関連市場としては、2017 年には医療分野において 1 兆 3,000 億円、健康管理・予防分野において 1,500 億円の市場規模が見込まれる。特に医療分野では今後 10 年で 2,000 億円の伸びが見込まれ、製薬企業と素材・分析機器メーカー等の診断技術開発企業との連携、制度整備、標準化等のさらなる取組が重要となっている。

こうした中、診断ツールとして大きな役割を担う DNA チップをはじめとするバイオチップの標準化を推進することにより、バイオチップ関連の産業化の促進及び市場の創生を目的としたバイオチップコンソーシアムが 2007 年 10 月に設立され、国内連携を軸に DNA チップのデータ信頼性・互換性向上のための基準・標準化の取り組みを開始した。

(6) 改訂のポイント

- 世界・日本の製薬会社のトップ5の比較、政府における研究開発費の日米比較、世界の医薬品市場の推移のベンチマーク等を策定、変更した。
- 民間での取組みに、京都大学が中心となって設立した「有限責任会社 iPS ホールディングス」の記述を挿入した。
- 関連施策として、「健康研究推進会議」及び「先端医療特区」の記述を追加した。
- 導入シナリオに新規プロジェクトを追加した。

II. 技術マップ

(1) 技術マップ

国民にとって最大の関心事項である健康とは、病気になった場合に早期に健康状態に戻れること、そして、そもそも病気にならず健康であり続けることに大きく二分される。この 2 つのニーズに対応するためには、副作用の少ない最適な医薬品の提供を可能とするとともに、将来の疾患リスクを事前に把握した上で、各人において日々の健康管理を行える環境の整備が重要となっている。

このため、①「より良い医薬品の開発・提供」及び②「健康産業の創造（治療から予防への転換）」を研究開発の柱として位置づけ、ニーズに従って必要な技術を技術マップ上に俯瞰した。

① より良い医薬品の開発・提供

個々人の病態や遺伝的背景に応じて薬剤を選択することを可能とするためには、画期的な医薬品の開発を促進し、薬剤の母数を拡大することが重要であり、このためには、疾患メカニズムを踏まえ、医薬品のターゲットとなるタンパク質、糖鎖、RNA 等

の生体分子を探索・特定し、これを医薬品としていち早く市場化することが必要である。また、薬効や副作用の大小は個々人により異なるため、多数の医薬品の中から個々人に応じた最適な医薬品の選択・処方が求められている。このため、技術マップでは、画期的な医薬品開発のための技術課題と医薬品の最適な使用のための技術課題に分け、前者については、医薬品の種類と医薬品開発プロセスという軸から技術課題を整理している。

なお、疾患と医薬品との関係については、がんやその他の疾患を見ても、その疾患メカニズムはある特定の疾患の中でも異なっており、また治療用のターゲットが複数存在することから、開発過程において、それぞれの疾患に対し固有の医薬品形態にとられない複数のアプローチが取られている。

② 健康産業の創造

病気を予防するためには、自らの罹患リスクを遺伝的に認識した上で、日々の健康管理を行える環境の整備が必要であり、このための技術課題を整理している。さらに、バイオマーカーに着眼し、当該技術より可能な予防及び超早期診断による健康維持のあり方について深化して検討を行い、技術マップを整理している。

また、①、②の戦略を推進するうえで重要となる「ゲノム情報等をベースとした新規診断技術」のビジネスモデルを【参考資料3】に示す。このビジネスモデルから以下の点が見込まれる。

○現在の臨床現場における利用は治療に比べて相対的に保険点数が低いものの、健康産業を含む公的保険以外の自己負担、民間保険、雇用主負担等でカバーするエリアでの展開は有望である。

○医薬品開発におけるファーマコゲノミクスの進展により、医薬品と診断法の一体化開発や臨床現場での薬物療法における投薬前診断分野における市場の成長性が期待できる状況である（ただし、この分野では診断技術を提供する企業と製薬企業との密な協業が必要）。

(2) 重要技術の考え方

この分野の具体的目標である

- ・ 画期的な医薬品をより早く効率的に提供することにより、優れた治療法を提供する。
- ・ 個の医療を支える薬剤のバラエティを拡大し、幅広い選択肢を提供する。
- ・ 個々人の特性・病態に合わせた最適な医療を実現する。
- ・ 疾患・罹患リスクの把握とこれに対応した予防・早期診断による適切な健康管理を実現する。

を踏まえて、下記の観点から重要技術を抽出し、技術マップに示している。

なお、我が国発の技術として脚光を浴びているヒト iPS 細胞については、再生医療分野だけでなく、創薬分野においても「健常人 iPS 細胞に由来する健常モデル細胞（心筋細胞、肝細胞など）を用いた毒性評価」、「患者 iPS 細胞由来の疾患モデル細胞を用

いた創薬スクリーニング」系の構築による創薬プロセスの効率化（成功率の向上やスピードアップ）や疾患メカニズム解明による新規医薬品の創出などに資する重要技術として幅広い観点から期待されており、技術マップ及びロードマップの該当箇所に明示している。また、iPS細胞研究の展開には、これまで取り組んできているES細胞及び体性幹細胞における知見が大いに活用されるものであり、我が国における幹細胞研究全体の加速が期待できる。

① 「画期的な医薬品・診断技術の開発」

創薬シーズの創出、バイオマーカーの探索、疾病状態における細胞内分子状態の把握等、画期的な医薬品及び診断技術の開発のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、画期的な医薬品ターゲットや各種診断マーカー探索のために重要となるゲノム、プロテオーム、糖鎖、RNA等の生体分子とこれらの相互作用解析や、研究を支援する研究ツール・機器の開発といった診断・医薬品開発への応用に必要な技術開発が挙げられる。

② 「医薬品開発の効率化」

成功確率の向上、製造コスト低減、開発期間短縮等、医薬品開発の効率化のために重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、医薬品開発の早期段階において毒性や薬剤有効性の評価に利用されるモデル生物系（iPS細胞から構築されるモデル細胞を含む）の構築、細胞ネットワーク解析、バイオマーカーの活用、化合物ライブラリーの充実、ファーマコゲノミクス等が挙げられる。

③ 「QOLの向上」

診断の正確さや早期性・簡便性を向上し、日々の健康状態を把握し、疾病状況に応じた適切な医薬品投与や治療を可能とする技術・機器、また、将来の疾患リスクを予測可能とし、日々の健康状態の把握により疾患を未然に防ぐ技術・機器。

具体的には、遺伝子情報と疾患との関連解明のための研究開発で得られた情報を有効に活用したバイオマーカーの同定、薬剤投与前に医療現場において安価かつ迅速に個人毎の疾患状態を詳細に診断するためのツールの開発と測定データの評価方法の標準化、薬物動態の個人差を考慮した薬効・毒性把握等が挙げられる。

④ 「日本の強みが活かせる技術分野の更なる強化」

日本における研究が進んでいる分野や他分野での技術力を踏まえた分野等、現在及び将来の技術競争力を保持する上で重要であると考えられる技術・機器。

具体的には、糖鎖、完全長cDNA、iPS細胞作製技術、発酵技術、中間体生産技術、微細加工技術等が挙げられる。

⑤ 「波及効果の高い技術」

他分野への波及も含め、波及効果の高い技術・機器。

具体的には、新たな研究領域として開拓されつつあり、画期的な医薬品開発への寄与が期待される機能性 RNA 等が挙げられる。

(3) 改訂のポイント

- バイオマーカーの利用のうち、バイオチップについて「データの標準化」を追加した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

技術マップで抽出された重要技術を中心として作成したロードマップにおいては、個別技術の進展を示すⅢ、「技術進捗」、技術の進展により得られる直接的な効果を上記の重要技術の分類のうち①～③毎に示したⅡ、「具体的効果」、及び、この「具体的効果」がもたらす医療現場における変化をⅠ、「医療現場における進展」として三段階に分けて整理した。

例えば、具体的効果の部分では、①2010 年にはがんの抗体医薬のターゲットがほぼ探索され、2025 年には自己免疫疾患や生活習慣病及び精神・神経疾患等の発症メカニズムがほぼ解明されているなど、種々の疾患に対する分子レベルでの解明が進むとともに、これを活用した医薬品の開発が進展することが予想される。②また、医薬品の臨床時のドロップアウトを低減する、ヒト臨床症状を反映した疾患モデルの作製技術の確立等により、医薬品の成功確率が現在の 5%程度から 2025 年には 50%程度まで向上するなど医薬品の開発効率の向上が予想される。③更に、早期診断・確定診断に有効な疾患マーカー、罹患リスク診断マーカー及び健康モニターマーカーが順次開発され、予防のための環境が整備されるとともに、1 つの診断ツールで複数の薬剤の薬効を評価できるなど 2015～2025 年には個々人の特性を踏まえた治療方法を提供するための技術の確立が見込まれる。

これらの技術的効果により、現在の治療を中心とした医療から、予防を重視した医療へと変遷し、また、病気になった場合であっても、現在、治療困難な疾患も含め、患者の体質・遺伝情報や病態に応じた個別療法の提供が可能になるなど、個別化医療が進展していると考えられる。

(2) 改訂のポイント

- 疾患モデル動物に「ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立」を挿入した。

Ⅳ. その他の改訂のポイント

○ベンチマーキングの更新

- 研究開発投資額・企業数の各国比較を追加した。
- 国際競争力ポジションの改訂を行った。
- 参考資料に平成 21 年度健康研究関係施策内示額を追加した。

創薬・診断分野の導入シナリオ

現状(2009年)

2010年

2015年

2025年

健康維持増進

～「疾患を予防する」ことが幅広く行われ、病気になる人が減ると共に、健康産業が拡大される～

疾患の早期診断

～疾患の早期診断により、早期段階での治療を行い、より早く回復すると共に医療費増大が抑制可能となる～

適切な治療法の提供

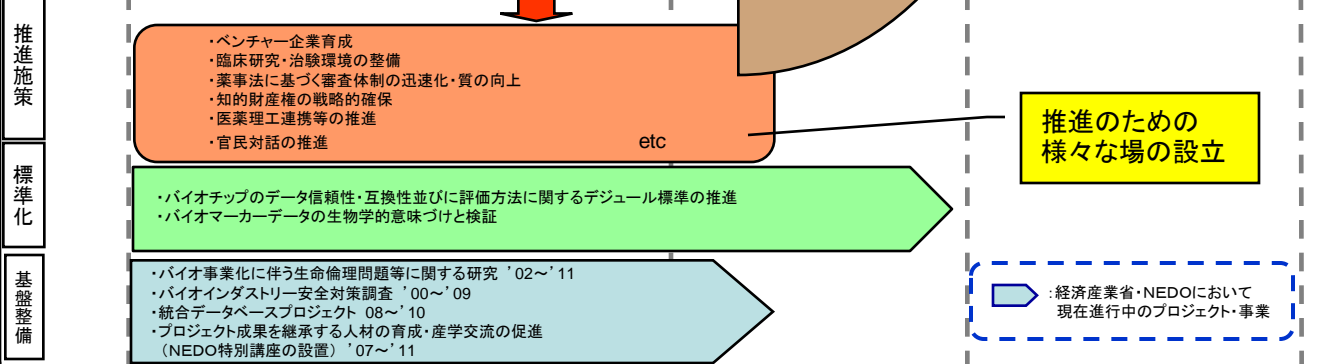
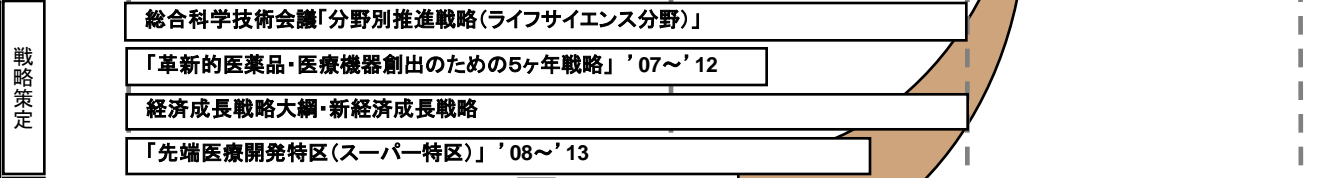
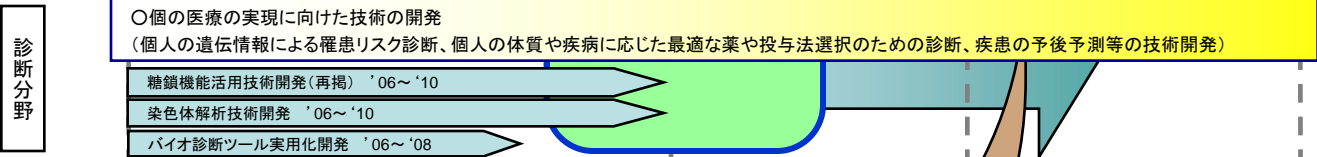
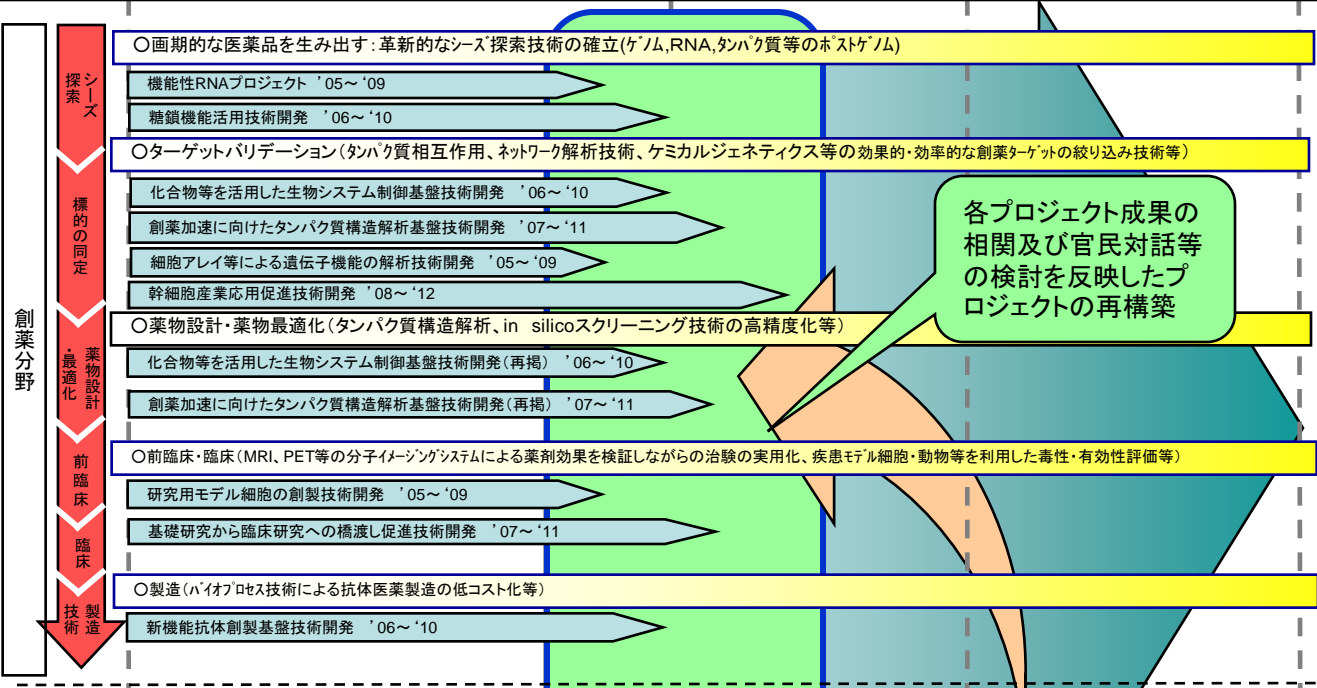
～治療がより低侵襲になり回復が早くなるとともに、患者の病状や個人差に基づき適切な治療法が選択できるようになり、治療効果の向上、QOLの向上が図られる～

将来像

疾患別・目標	がん患者 5年生存率	60% (20%向上※1)
	<生活習慣病関連> ・糖尿病 ・脳卒中 ・心疾患	・発生率の20%改善※1 ・死亡率の25%改善※1 ・死亡率の25%改善※1
産業構造	創薬 創薬ベンチャーの増加 異業種参入の進展	創薬開発プロセスの分業化の進展
	健康 健康管理と医療の連携による健康サービス産業の創出	健康産業の拡大

※1:健康フロンティア戦略(2005年-2014年)による。

創薬パイプラインに即した基盤技術の確立



創薬・診断分野の技術マップと重要技術(1/2)

ニーズ

重要技術の抽出項目	凡例
画期的な医薬品・診断技術の開発	水色
医薬品開発の効率化	黄色
QOLの向上	ピンク
強みが活かせる技術分野の更なる強化	茶色・太字
波及効果の高い技術	下線・太字

* マップ上、上記のいずれかの色がついている技術が重要技術

戦略1 より良い医薬品を生み出し、利用できるようにする

【革新的なシーズ探索技術の確立】

シーズ探索

○シーズを探索する方法としては、
 ・文献や学会発表の先行品調査から推測
 ・民間伝承療法(薬)調査から推測
 ・病態研究から明らかになった新規生理作用から推測
 ・ゲノム情報、新規疾患遺伝子から推測

従来技術

★臨床データとゲノム研究の統合的推進による疾患メカニズムの解明

○遺伝子機能解析
 ・ゲノム解読(DNAシーケンサー、PCR、ゲノム・mRNA、ゲノムの多様性(SNP、欠失等)、エピジェネティクス、比較ゲノム)
 ・遺伝子操作・導入技術(マイクロインジェクション、ベクター、導入試薬、機能性RNA)

○疾患遺伝子の推定
 ・マイクロアレイ、SNPs、ゲノム・染色体構造解析
 ・SNPアソシエーション

○タンパク質の取得技術
 ・組換えタンパク質(動物細胞)
 ・無細胞タンパク質合成系
 ・ペプチド合成技術(修飾体・長鎖)
 ・新規原理に基づくタンパク質分離担体/手法
 ・特定機能分子の作出(ファージディスプレイ、キメラ抗体、ヒト抗体)

○タンパク質の機能解析
 ・発現頻度解析(マイクロアレイ、MS)
 ・相互作用解析(MS、プロテインチップ、SPR、クオアーツ、光学顕微鏡)
 ・一分子ソーティング技術

○タンパク質の構造解析
 ・結晶化技術
 ・タンパク質構造解析(電子・X線顕微鏡、NMR、X線レーザー、中性子線回折)
 ・データベース

○タンパク質修飾
 ・糖鎖解析・制御
 ・糖鎖付加部位の推定(特にムン型)
 ・タンパク質/ペプチドへの糖鎖付加技術

○代謝物
 ・メタボローム解析
 ○幹細胞操作技術
 ・幹細胞作製・樹立技術
 (iPS細胞、ES細胞、組織間細胞等)
 <幹細胞共通技術>
 ・特定細胞の培養・分離
 ・分化・培養(クローン技術、分化マーカー)
 ・分離(フローサイトメトリ、セルソーター)

○細胞活用関連技術
 ・遺伝子/タンパク質発現の検出、一分子計測
 ・細胞内外分子の機能(定性・定量)
 ・動態解析(蛍光・共焦点・全反射顕微鏡)
 1細胞解析

○統合バイオロジー
 ・臨床インフォマティクス
 ・健康インフォマティクス

○研究基盤整備
 ・バイオリソース(サンプル、完全長cDNA、細胞株、微生物株、モデル生物等整備)
 ・各種データベース

★革新的な創薬コンセプトアプローチ技術の開発
 ○既存薬剤のマルチターゲット化技術
 ○ネットワーク創薬技術
 ・転写制御メカニズムの解析技術
 ○エピジェネティクス創薬技術
 ・環境・年齢要因などによる遺伝子発現
 ・RNA遺伝子
 ・メチル化、アセチル化解析技術

様々なレベルの情報を統合し生命現象の解明へとつな

【個別製品毎に特異的に見られる課題】

ターゲットハリデーション

○創薬標的タンパク質の同定方法としては、
 ・タンパク質の分離は二次元電気泳動法に依存する
 ・タンパク質の同定は伝統的な方法による
 ・遺伝子改変生物(ノックアウトマウスなど)も用い同定する
 ・評価用の標的タンパク質は、少量しか得られない
 ・ハイパフォーマンスを利用し配列情報検索、データベース実

○標的タンパク質の同定・解析技術
 ・微量タンパク質操作技術
 ・定量的質量分析
 ・同一遺伝子からのmRNAの多様性(SV、TSSなど)やゲノムの多様性(cSNP、欠失など)を考慮したタンパク質解析技術

○標的タンパク質探索効率化
 ・標的タンパク質構造解析技術
 ・分子間相互作用解析技術
 ・膜タンパク質の汎用的解析技術
 ・ケミカルジェネティクス
 ・解析用タンパク質の大量発現系構築
 ・翻訳後修飾の反映・活性を保持したタンパク質生産
 ・膜タンパク質等難溶性タンパク質無細胞合成系・汎用解析系
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ・細胞内ネットワーク解析技術

○糖鎖機能からのターゲット探索技術

○疾患特異的RNAの同定技術

○対象標的の同定技術

○体外細胞処理技術
 ○細胞機能測定技術
 ○特定細胞の分離・回収技術

○治療効果・副作用等評価技術

低分子化合物の薬物設計

○創薬標的タンパク質と反応する化合物の選別・最適化
 ・多数の化合物をスクリーニングし候補化合物を見出す
 ・試行錯誤的にリード化合物の最適化を行う
 ・薬物構造活性相関(SAR)を利用し薬物構造を設計する
 ・invitro invitro試験で薬効スクリーニングを行う
 ・研究者の経験や勘に負うところが多い

○標的タンパク質に最適な薬物設計
 ・構造多様性に富んだ化合物ライブラリの構築
 ・ケミカルライブラリーの化合物機能アノテーション
 ・ドッキングベースの in silicoスクリーニング
 ・低分子・タンパク質親和性解析技術
 ・疾患モデル細胞(疾患ヒトiPS細胞の活用等)
 ○標的の特異的デリバリーを保持した薬物設計

バイオ医薬品の薬物設計・薬物最適化

○生体適合性と効果の最適化
 ・ナチュラルタイプに近い製剤を製造
 ・効果を向上させる技術は未完成

○免疫原性のないタンパク質創製技術
 ・抗原性を呈さないタンパク質創製技術
 ・ステルス技術
 ・ヒト型免疫モデル実験動物/実験系の開発
 ○人工タンパク質創製技術
 ・低分子化合物・ペプチド化技術
 ・Long Acting化技術

○効果的な抗体の作製技術
 ・抗体の半減期の適正化
 ・低分子化、アブタマー化
 ・特異性の向上
 ・無細胞系での発現系、宿主の改良
 ・抗体の改変技術

○RNA配列設計技術
 ・サイレンシング効果の高い配列設計技術
 ・効果を高めるモディフィケーション技術

○遺伝子組換え細胞の作成技術(発現系、支援機器/試薬)
 ・迅速発現安定株
 ・発現調整技術(KO/KI/KD/OE)

前臨床・臨床

○治療対象化合物の薬効/安全性の確認
 ・疾患モデル動物を用いて既存薬との効果/安全性を比較
 ・薬物動態試験の実施
 ・製剤技術の開発
 ・急性/亜急性/慢性など毒性確認技術の実施

○生体そのまま薬効効果を検証できるイメージング技術
 ○疾患モデル細胞・動物(疾患ヒトiPS細胞の活用等)を利用したヒトでの有効性・問題点評価技術
 ○薬物動態シミュレーション
 ○細胞・臓器モデル(健康ヒトiPS細胞の活用等)による薬物代謝および安全性評価技術
 ○投与方法変更技術(静注から経口へ)
 ○ターゲットへのデリバリーシステムの開発
 ・DDS等の新規投与方法の開発

○品質(保存安定性)のための技術

○医薬品中間体製造のための発酵技術
 ○生成・代謝変換遺伝子

○低コスト、高収率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ・糖鎖修飾制御

○低コスト、高収率な生産系の開発
 ・発現系・発現宿主・培養技術開発
 ○抗体製造の低コスト化技術
 ・動物細胞以外のヒト抗体産生の宿主開発
 ・精製技術開発

○治療用ベクター開発(組込部位の特定・遺伝子毒性の低減技術)
 ○細胞内への高効率導入技術
 ○siRNA、ncRNAの作用メカニズム解析

○安全性評価

○天然糖質原材料の開発技術(糖質医薬品)
 ・グリコサミノグリカン糖鎖原材料製造技術

○細胞機能/細胞内の分子挙動の測定技術/機器・試薬
 ・In vitro 安全性(毒性)・代謝・薬効評価技術

○細胞タイピング技術
 ○移植後の長期安全性、トラッキング

○DNAワクチン技術
 ○感染診断・検査技術

○安全性評価、品質管理

バイオマーカーの同定

○バリデーショナル、アッセイ法に関する技術開発
 ○ファーマコゲノミクス進展のための薬物の生体内作用機構の解明
 ○薬物と生体タンパク質の相互作用データベース

疾患状態の適切な把握に基づき薬剤評価

投与前診断ツール開発

○安価で迅速な疾患関連遺伝子多型等解析技術
 ○安価で迅速な細胞診断技術(遺伝子・タンパク質等の薬物標的分子・バイオマーカー)
 ○DNAチップの信頼性向上
 ○患者に負担をかけない生体試料採取法

戦略2における活用

1. 画期的な医薬品をいち早く生産できるようにする

課題解決のための技術

2. 医薬品の最適な使用方法を確立する

健康で長生き 病気になるたとしてもいち早く健康に戻りたい

個の医療、健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

・画期的な医薬品の迅速・効率的な提供
 ・薬剤パラエティの増加

個々の特性に応じた使用方法の確立

全医薬品共通

低分子化合物薬

(糖)タンパク質医薬

抗体医薬

核酸医薬(遺伝子治療含む)

糖質医薬

細胞医薬

ワクチン

診断ツール、診断キット

創薬・診断分野の技術マップと重要技術(2/2)

ニーズ

戦略2 健康産業を創造する(治療中心から予防中心へ)

バイオマーカーの探索

戦略1のシーズ探索技術の活用

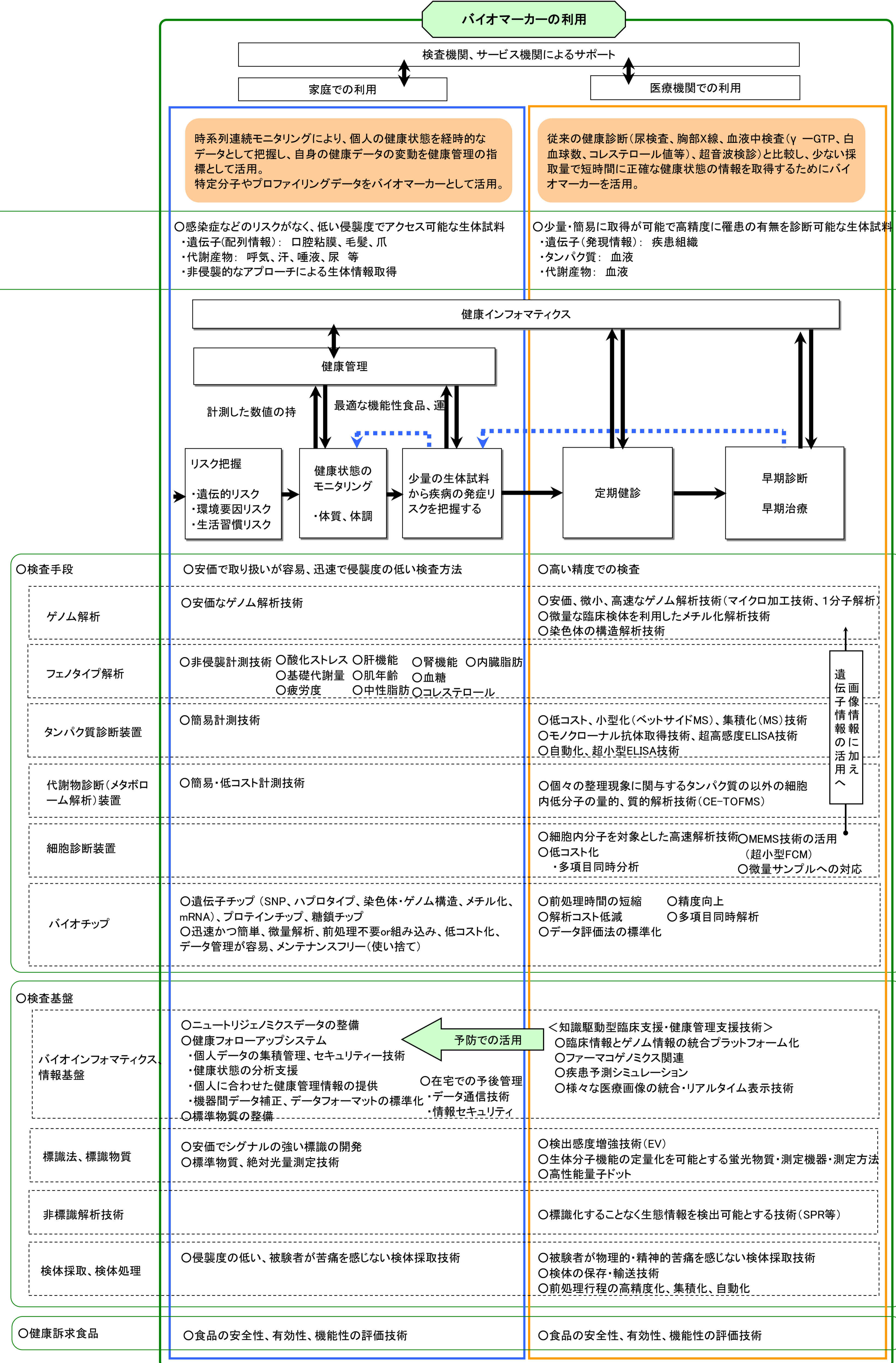
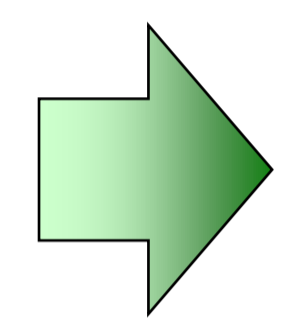
現状と将来像

疾患の発生や健康状態の回復のエビデンスとして有用な分子やプロファイリングデータを探索。

対象サンプル

- 生体試料
 - ・遺伝子(配列情報)
 - ・血液
 - ・組織・疾患組織
 - ・代謝産物
- 遺伝子
 - ・ゲノム解読(DNAシーケンサー、PCR、ゲノム・mRNA、ゲノムの多様性(SNP、挿入・欠失等)、エピジェネティクス、比較ゲノム)
 - ・遺伝子操作・導入技術(マイクロRNAシミュレーション、ベクター、導入試薬、**機能性RNA**)
 - ・マイクロRNA、SNPs、ゲノム・染色体構造解析
 - ・SNPタイピング技術
- タンパク質
 - サンプルの前処理技術
 - ・メジャータンパク質の除去技術
 - ・クロマトの多重化、多段階システム化
 - ・分子分離分取技術
 - 機能解析
 - ・発現顕度解析(マイクロアレイ、MS)
 - ・相互作用(インタラクトーム解析(MS、プロテインチップ、SPR、クウォーツ、光学顕微鏡))
 - ・分子ソーティング技術
 - 修飾
 - ・糖鎖解析
- 代謝物
 - ・メタボローム解析
 - ・非侵襲サンプル(呼吸、汗、唾液、尿等)からのサラゲートマーカー探索
- 細胞
 - ・iPS細胞の作製
 - ・遺伝子/タンパク質発現の検出、一分子計測
 - ・細胞内外分子の機能(定性・定量)
 - ・特定細胞の培養・分離
 - ・動態解析(蛍光・共焦点・全反射顕微鏡、細胞アレイ、1細胞解析)
 - ・分化・培養(クローン技術、分化マーカー)
 - ・分離(フローサイトメトリ、セルソーター)
 - ・細胞表面特異的抗体の開発
- 組織
 - ・細胞間情報伝達(サイトカイン技術)
 - ・染色技術(in situハイブリ、免疫染色)
 - ・保存(凍結保存技術)
- 統合バイオロジー
 - ・臨床インフォマティクス
 - ・健康インフォマティクス
- エピジェネティクス
 - ・環境・年齢要因などによる遺伝子発現
 - ・RNA遺伝子
 - ・メチル化、アセチル化解析技術
 - ・血液中のメチル化DNA検出技術
- 臨床サンプル
 - ・統計学的な視点を持った臨床サンプル収集
 - ・臨床サンプルの保管や処理技術のプロトコル化

病気になるらず、健康でいたい
健康で長生き



健康インフォマティクス基盤構築

自己健康管理支援システムの構築・整備

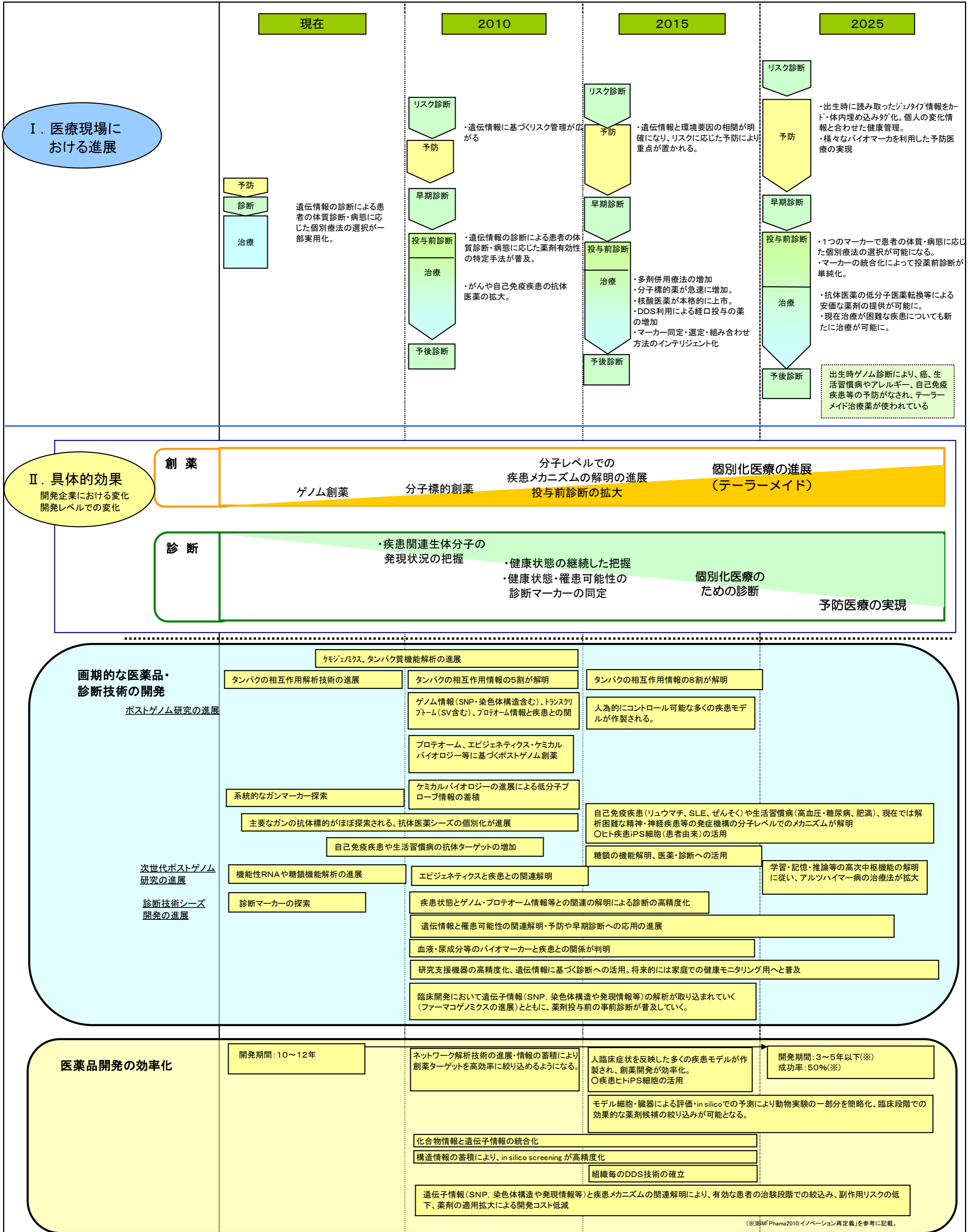
予防・超早期発見を目的とした新案ツール、診断キット

・医療費の削減

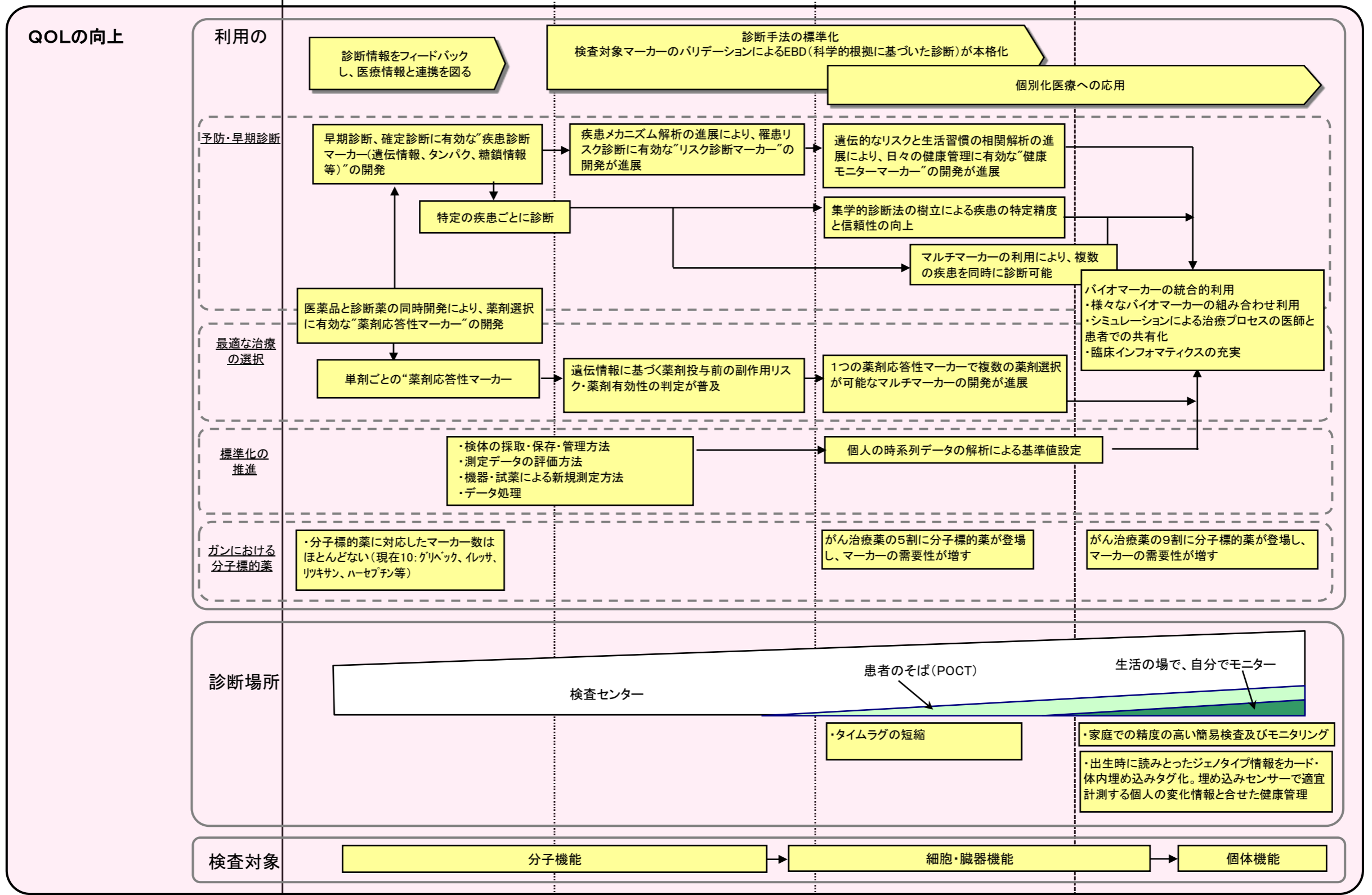
・早期回復、健康維持

個の医療、健康安心社会の実現(個人に合わせた優れた治療法の提供・予防)・産業競争力の強化

創薬・診断分野の技術ロードマップ



		現在	2010	2015	2025
医薬品の変化	低分子医薬	ゲノム情報に基づいた分子標的薬シーズの創製(標的:GPCR,核内レセプター,キナーゼ等)	より多くの疾患において、分子標的薬が活用されていく。	抗体医薬の機能を代替する低分子医薬実現	多くの疾患について低分子医薬が製造される。薬剤の適用拡大も進展。
	抗体医薬		ガンに対する抗体医薬がほぼ提供され、テーラーメイド型抗体治療が開始される。(例:個々人のガンの状態に合わせた抗体を処方できる)	パーキンソン・アルツハイマーに対する抗体療法が行われている。 抗体医薬の低分子化 DDS利用の抗体医薬(※)が上市される。(※:抗体そのものをDDSを利用して組織へ集中させる。) 細胞内分子を標的とする抗体が創製される。	
	核酸医薬		siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 導入効率が良く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。	RNAiの薬剤として使用が開始される。	
	(糖)タンパク医薬	バイオジェネリック(後発品)の上市	タンパク修飾技術やDDS利用の第2世代タンパク医薬への置換えが進む	プロテオーム情報に基づく新たなタイプのタンパク医薬が作られる。	
	糖質医薬				人工的グリコサミノグリカン医薬品
	細胞医薬		体外で分化させた細胞を用いた治療法が始まる。	遺伝子を改変した細胞を用いた治療が始まる。	特定の目的に応じて自在に細胞を制御できる技術が確立(人工臓器)
	ワクチン	細胞性免疫を誘導するワクチン開発(臨床試験開始)		免疫機能を増強制御する薬剤・方法が開発される。	生体防御機構の誘導を自在にコントロールできるワクチン
			パーキンソン・アルツハイマーに対するワクチン療法が行われている。		



	現在	2010	2015	2025
<p>Ⅲ. 技術進捗</p> <p>創薬(診断)</p> <p>【シーズ探索・ターゲットハリデーション】</p>				
シーケンサー	DNA解読技術の進展	現在の100倍の速度	現在の1000倍の速度:個人のゲノム解析が安価で可能に	疾患リスク把握・予防技術への展開
エピジェネティクス	癌との関連等、一部で機能が示唆される。	癌メカニズムとの関係性説明	ターゲット分子のエピジェネティックな制御に利用	移植医療への応用
機能性RNA	in vitroでの転写制御に利用	創薬ターゲット同定への活用	特定遺伝子の転写・翻訳制御による治療の実施	
DNA・発現頻度等解析技術	研究用の基本技術が確立しつつある。データの互換性や機器毎のデータの一致率の低さに課題。	同時多項目診断チップの実用化 (コンテンツが順次増加するとともに、医療機関から家庭へと普及)	薬剤投与前の有効性・副作用診断ツールとしての活用が一部で実用化	●多くの疾患の効果判定がゲノム解析で可能となる。
プロテインチップ・抗体チップ	検出感度の向上・タンパク質発現技術等要素技術の開発	血液・尿中のバイオマーカーの同定のためのツールや診断チップとして利用	診察所で簡便かつ安価に活用される。	個人・家庭レベルでの罹患可能性把握・健康モニタリング機
タンパク質取得技術	・組換えや発現が一般化し成熟しているが、インクタンクタンパク質の発現技術としては不十分。 ・無細胞合成系が実験室で実用 ・ペプチド合成技術が一般化し成熟	・発見・分離・精製技術が向上し、膜タンパク質/タンパク質の取得技術が確立 ・8割のタンパク質を取得	・(ヒト発現臓器と同等の糖鎖構造や修飾をもつ)天然型糖蛋白質の発現や合成が自由自在となり、自動化されている。	・必要に応じて患者別に治療に必要な治療薬を選択するための検査が可能(→「1分子ソーティング」の項)となり、「個の組換え体」がGMPで低コストで供給される。(ワクチン、抗体など)
分離担体・機器修飾	・合成担体等を利用した化学的クロマトグラフィーによる「分子群」ソーティング ・機械駆動型ポンプによる送液系 ・分光光学的モニタリング	・コンベンショナルな「分子群ソーティング」から「1分子ソーティング」への移行が模索され、実用化研究が進展。	・高速な「1分子ソーティング」が可能となり、生体分子は1分子毎に多数のパラメータ(サイズ、修飾、切断など)が解析され、その集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられている。 ・用途によって、「分子群ソーティング」と「1分子ソーティング」が使い分けられる。	・「1分子ソーティング」が高速スケールアップされ、短時間で膨大な分子データの獲得が可能となり、個の医療・診断に活用されている。 ・極少量の検体から、同時に多数の分子について、それぞれ多項目パラメータの取得が可能となり、確定診断や健康管理に活用されている。
タンパク質相互作用解析	広範に解析中であり、いくつかの系では成果が出ている。	ハイスループット化・汎用性・検出効率・相互作用部位解析精度の向上	リアルタイムでタンパク質相互作用が1分子レベルで測定可能 (相互作用検出の蛍光プローブ等が進展)	
糖鎖機能解析	構造解析の基盤技術に目処	構造解析装置が普及。糖鎖解析が本格化、診断技術、バイオ医薬品評価等への実用化	ガン、感染症、免疫等の分野において糖鎖機能の幅広い応用が行われている。	
構造解析技術	膜タンパク質発現技術の向上 結晶化の効率化	・NMR・軟X線レーザー・中性子線・低温電子顕微鏡(高分子量タンパク質への適用拡大) ・単粒子解析等新たな構造解析技術の進展	膜タンパク質以外については、一次構造から推定可能に。 タンパク質の動的な構造変化が観察可能になる。	・特別な施設や機器を保有しなくても、検査対象となる高分子の構造や修飾は、極限られたパラメータを取得してデータベースで検索可能。
メタボローム解析	・ヒト、モデル動物由来の細胞、組織、その他生体材料(血液、尿、唾液など)中の代謝物の網羅的解析で、病態や薬剤応答性(薬効、毒性)のバイオマーカーの探索が始まっている。	・ヒト臨床サンプルやモデル動物でのメタボロームのプロファイリングデータベースの蓄積とアルゴリズムの進展で、ヒトの疾患マーカーや動物モデル系(げっ歯類)におけるヒト臨床予測マーカーが数多く見だされている。	・ヒトおよびモデル動物でメタボローム統合データベースが完備する。	・ヒト生体サンプルのメタボローム解析で、即日の病態診断、薬剤応答性予測が可能となる。

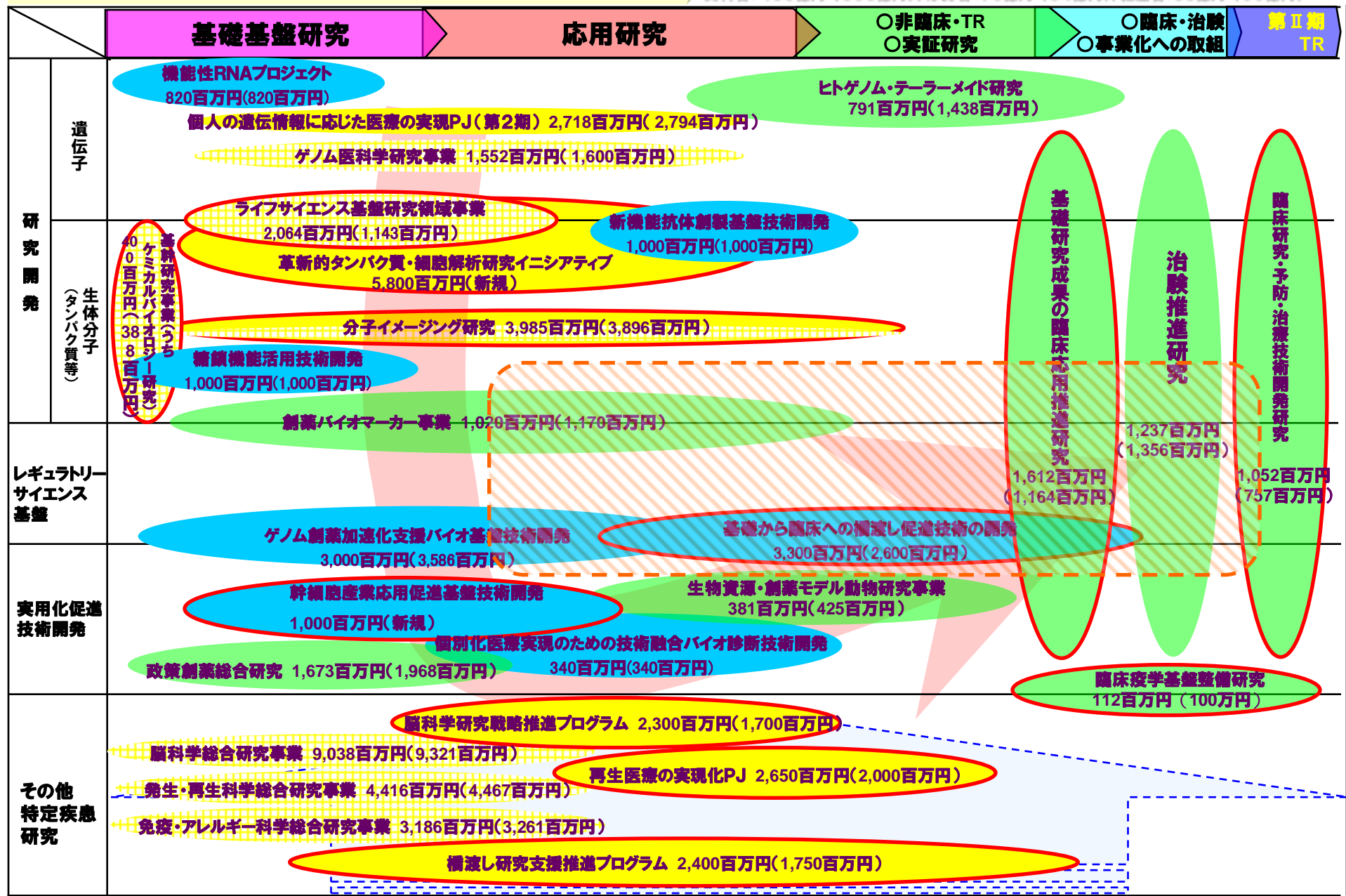
※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

	現在	2010	2015	2025
特定細胞・組織の培養・分離	<ul style="list-style-type: none"> ・浮遊細胞については、1細胞単位での分離が可能。 ・付着細胞については、レーザーを利用した特定細胞の分離が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> ・性質を維持したインパクトながん細胞の分離培養が可能となりターゲット探索、薬剤開発が効率化される。 ・1細胞分離の全く新たな原理が登場。 		
疾患モデル動物・細胞系	<ul style="list-style-type: none"> 臓器モデル・細胞モデル(※)による創薬ターゲット絞り込み・ネットワーク解析(※)iPS/ES細胞等ヒト細胞による疾患モデル系の構築 多様な生物を活用した疾患モデル系の構築 ・疾患モデル数が少なく(特に霊長類)、データベースも不十分で、かつ統合されていない。 ・導入遺伝子の発現コントロールによる、疾患の程度の調節ができるモデル動物の開発は途上段 	<ul style="list-style-type: none"> ヒト化マウスによる疾患モデル系の確立 ・霊長類を含め、疾患モデル動物の作成技術の進展により、モデル数、種類が増加し、それら動物の維持・分与システムが確立される。 	<ul style="list-style-type: none"> 患者毎の性質を維持したインパクトながん細胞の分離培養が可能となる。 ・疾患モデルの動物種ごとのプロテオーム・メタボローム、メタボリズム(生理学的)解析法が確立し、系統化される。 	<ul style="list-style-type: none"> ・主要な疾患全てにおいてモデル動物が整備される。
細胞内ネットワーク解析 ／セローム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞アレイによるネットワーク解析 セロミクス技術の進展 <浮遊細胞> ・1細胞単位での分析が可能。 ・レーザー光学系や高速演算系を備えたフローサイトメトリやセルソーターなどの配備が基幹施設で稼働 ・抗体磁気ビーズなどを利用した細胞の大量分離が可能。造血幹細胞移植などの移植細胞濃縮や不要細胞の除去が自動化、臨床利用。 ・一部に、診断目的で細胞膜マーカーや細胞内分子を定量的に測定。 ・移植細胞の品質管理に利用。 ・機器機材や消耗品となる試薬が高価で、運用が高コスト。 ・走化性因子の探索、走化性測定法の開発 	<ul style="list-style-type: none"> フローサイトメトリ用の機器開発元は、寡占状態から脱し、国内外各社で開発・市販される。特に低廉で小型な装置の実用化が始まる。 ・ハードウェアは次世代に移行し、より高速で安定な分離と解析が実現。 ・1細胞解析の全く新たな原理が登場。 ・抗体に依存しない細胞標識法や、分子標識法が登場し、実用化途上。 ・1細胞から多数(30以上)のパラメータが同時取得可能となっている。 ・走化性関連研究の成果として、細胞動態を指標とする創薬スクリーニングシステム開発 ・走化性関連研究の成果として、細胞動態制御薬の開発開始 	<ul style="list-style-type: none"> ・低価格のペンチトプ型のフローサイトメトリ装置が広く普及し、多様な疾患において細胞マーカーの検出類型や、定量化された臨床データが豊富に蓄積されている。 ・特定の表現型をもつ細胞に、1細胞単位で、核酸や蛋白質などを導入したり、機能を欠失する機能など、新たなモードが実現。 ・新たな原理に基づいた細胞解析装置や標識法、可視化法が実用化され、研究用に活用されている。 ・走化性関連研究の成果として、癌転移制御薬の開発 ・走化性関連研究の成果として、動脈硬化制御薬の開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・個々の細胞の表現型と遺伝子型の参照データセットが揃っており、最少のパラメータセットを測定することによって、それぞれの細胞や細胞群、組織や臓器の運命や機能の変化について予測可能となる。 ・走化性関連研究の成果として、癌の転移の大半が薬により抑制可能に。
細胞内イメージング技術	<ul style="list-style-type: none"> 細胞内での各分子の挙動が平均値として検出されている。 分子間相互作用解析結果の生細胞内での検証 	<ul style="list-style-type: none"> 個々の分子の挙動がリアルタイムで解析可能になる。 分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子レベルでの解析可能 1分子レベルでの分子イメージングのスループットの向上・高精度化によりスクリーニングに応用可能。 	
臨床インフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> ・検査値の統合処理 ・多変量解析が一部で実施(卵巣癌) 	<ul style="list-style-type: none"> 情報の蓄積が可能となり、①シーズ探索に活用できる 血液・尿成分のバイオマーカーと疾患の関係が判明 ・テラーメイド医療の有効性の検証。 臨床データと各種omicsデータの統合 ・免疫ゲノム検査に至るまで ・検査方法の標準化・データの統一化が可能と 	<ul style="list-style-type: none"> ・臨床インフォマティクスデータが蓄積され、バイオマーカーのプロファイリングによるテラーメイド医療の治療が普及。 ・検査の多変量解析による効率化により、個人別基準値の設定・管理ができる 	<ul style="list-style-type: none"> 超早期発見、超早期診断が可能となり、罹患時点・罹患早期で治療が可能となる。 ・個人別の基準値データベースのカード化
【薬物設計/前臨床・臨床】				
<ul style="list-style-type: none"> ・ライブラリー構築、 ・化合物アノテーション、 ・低分子-タンパク相互作用解析 	<ul style="list-style-type: none"> タンパク質相互作用解析技術(Y2H, MS, タンパクチップ, SPR等) 化合物アノテーション・ケミカルジェネティクス HTS技術の進展 コンピケム・分子インプリンティング、構造多様性に富んだライブラリー構築 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoと連携した化合物設計がハイスループットで可能に。 		
In silico スクリーニング	<ul style="list-style-type: none"> ・精度向上・情報量拡大により構造情報に基づいたドラッグデザインが可能。 ・複合体や標的タンパク質の相互作用も含めたスクリーニング 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞機能をシミュレート可能なバーチャルスクリーニング技術が確立 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ上での薬剤設計 	
抗体作製技術	<ul style="list-style-type: none"> 抗体の特異性向上・製造コスト低減技術 宿主の多様化 低分子化・アプタマー化 		<ul style="list-style-type: none"> 細胞内タンパクをターゲットとする抗体医薬の作製技術が確立 	
細胞医薬	<ul style="list-style-type: none"> 体外での細胞の分化制御技術 	<ul style="list-style-type: none"> 免疫原性の低い細胞の創出 	<ul style="list-style-type: none"> 疾患状態や外部刺激に応じて効用や細胞機能が制御できる細胞医薬 	
核酸医薬	<ul style="list-style-type: none"> siRNAを活用した核酸医薬開発におけるベクターの開発 	<ul style="list-style-type: none"> 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 		
ヒト細胞による毒性・有		<ul style="list-style-type: none"> 細胞チップ技術とモデル細胞・臓器との組み合わせ 		
生体そのまま薬剤効果を検証できるイメージング技術		<ul style="list-style-type: none"> 情報のデジタル化による網羅的解析・スループット向上 動物実験に適用するための分解能の向上・小型化 		
薬物動態シミュレーション	<ul style="list-style-type: none"> 半減期・変異原性については簡単に分かる。それ以外で課題がある。候補化合物を実際にアッセイせずに評価できるようにする。既に設計の段階でどの酵素に代謝を受けるかは織り込んだ上で開発が進展している状況。 	<ul style="list-style-type: none"> in silicoでの予測による動物実験の簡略化 	<ul style="list-style-type: none"> 個人差も反映したシミュレーションが可能になる(試験の対象の選択にも利用可能) 	

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。

		現在	2010	2015	2025
DDS (低分子・抗体)		<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲティング、持続時間延長、溶解温度の改善等々、要素技術が多い。 ・ガンの場合はターゲティングが主要課題 ・ガン以外においては抗体医薬もデリバリーが課題 	<ul style="list-style-type: none"> リボソーム型の一部実用化、様々な接着因子の利用 ①低分子をリボソームに包み、膜上に抗体を入れることでターゲティング ②がん細胞と正常細胞内での代謝酵素の活性の差を利用する手法も存在。これらが実用化されていく。 	<ul style="list-style-type: none"> DDS利用抗体の実用化 細胞を利用した運搬技術が進展(タンパク医薬、抗体医薬) 	
	DDS (核酸)		<ul style="list-style-type: none"> (共通) プラッドブレンバリア(BBB)の制御 導入効率が高く、毒性が低いベクターが遺伝子治療に利用できるようになる。 siRNAのサイレンシング機能を薬剤に利用 	<ul style="list-style-type: none"> RNAiの薬剤としての使用が開始 	
【製造技術】		<ul style="list-style-type: none"> バイオロジクス製造技術の改良(宿主: ウシ・ニワトリ・植物や糖鎖改変技術等) バイオロジクス製造技術の改良(分離精製技術・大量生産・低コスト化) 			
診断	【検査手段の開発】				
	ゲノム診断装置	<ul style="list-style-type: none"> ・DNAシーケンサーを利用 ・SNP解析が実施されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・疾患別解析ゲノムの統一化 ・解析装置の小型化・高速化 	<ul style="list-style-type: none"> 異型・多型を含めた個人レベルでの遺伝子情報解析 	<ul style="list-style-type: none"> 個人データのカード化・体内埋め込み型
	タンパク質診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 一般生化学検査では、化学的多項目自動測定が可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 質量分析装置に定量性を付加する技術の開発 	<ul style="list-style-type: none"> ・定量的MSの普及 ・蛋白質/糖/核酸などの広範囲なマーカー検出に定量的MSが利用される。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ベンチトップ/ベッドサイドMSの開発 ・生体1分子毎に多項目(サイズ、修飾、切断など)が、同時計測可能となり、集合データによって特定の分子と病態との関連が調べられる。
	代謝物診断(メタボローム解析)装置	<ul style="list-style-type: none"> 分子特異的定量分析では、RIAやELISA。 	<ul style="list-style-type: none"> GC-MS、LC-MS、CE(キャピラリー電気泳動)-MS、NMRの活用により、多くの代謝物種の網羅的解析が可能 	<ul style="list-style-type: none"> すべての代謝物種の網羅的解析を可能とする、定量的・高感度解析手法が開発される。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップ/ベッドサイドで使用可能な低コスト化解析装置が開発される。 メタボロームデータベースの蓄積、アルゴリズムの進展で、オールインワン型病態診断装置が開発される。
	細胞診断装置	<ul style="list-style-type: none"> 光学的分子標識が必要/細胞膜分子 FCM: 1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高額大型装置(海外製寡占) ・高コストな運用 ・診断/臨床利用は限局(主に研究) 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光標識法が多様化/細胞内分子 FCM: 1細胞計測(散乱光・蛍光) ・高性能高額機と低価格機の二極化 ・既存機器の低価格小型版が普及 ・診断/臨床利用へ展開 	<ul style="list-style-type: none"> ・ポストソーティング解析技術の融合 ・1細胞動的解析技術(*)の適用 ・非標識による細胞分子同定が可能 FCM/CS高性能低価格機の普及 ・診断/臨床ベッドサイドで常用 	<ul style="list-style-type: none"> ・浮遊細胞・付着細胞の双方について、1細胞の動的変動 多変量パラメータ ・細胞表現型と遺伝子型のプロファイリングデータによって、細胞/組織/臓器の運命や機能変動の予測が可能
		<ul style="list-style-type: none"> ※FCM: フローサイトメトリ 1分子計測技術装置の発展と普及 ・標識法(高寿命蛍光・蛍光/分子プローブ) ・細胞内分子標識法 ・高出力半導体レーザー ・装置(顕微鏡/検出器/制御装置)の単純化と低価格化 ・新原理の出現 細胞機能改変技術の進展(核酸、蛋白質等の無毒性 高効率導入、機能発現/機能抑制/刺激付加) 	<ul style="list-style-type: none"> 分子群分離から1分子ソーティングへ 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子ソーティングと1分子解析の融合 	<ul style="list-style-type: none"> ・1分子計測・1細胞計測が高速かつスケールアップされ多変量パラメータを高速演算が可能となる。 ・これにより、表現型と遺伝子型のプロファイリングや疾病/病型/疫学的データとの連鎖解析が可能となる。 ・その後、出力の単純化により、細胞/組織/臓器/個体の運命を予測可能となり、確定診断個の健康管理に活用
化学的クロマトグラフィーや電気泳動法による分子群分離～分子群モニタリング	<ul style="list-style-type: none"> 分子群分離から1分子ソーティングへ 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子ソーティングと1分子解析の融合 	<ul style="list-style-type: none"> 1分子計測値の集積により、特定分子群の特性を把握 		
バイオチップ	<ul style="list-style-type: none"> 共通基盤 マイクロfluidicチップ ・サンプルの微量化 ・操作の簡便化 ・検査時間の短縮 	<ul style="list-style-type: none"> ナノfluidicチップ(20マーカー、100検体同時測定) マルチ解析の臨床応用(100マーカー以上、非標識検出) ・人工リガンド 	<ul style="list-style-type: none"> 統合バイオチップ: 確定診断精度の飛躍的向上 複数のマーカーを利用して、1つの疾患の診断精度を向上 マルチバイオチップ 1つのバイオチップで複数の疾患を同時診断 パネル化して利用普及 		
核酸	DNAチップの実用化	抗体チップの実用化	プロテインチップの実用化	セルアレイの実用化	ティッシュアレイの実用化
細胞					
組織					
【検査基盤】					
バイオインフォマティクス	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報のデータベース化進展 ・タムの統一 ・画像データのストレージ ・データベース間の相互利用の実現 ゲノム情報の統合化 	<ul style="list-style-type: none"> 臨床情報とゲノム情報の統合プラットフォーム化 ニュートリジェノミクスデータの整備 遺伝子と食品の関係が明らかとなり、リスクに合わせた食生活の選択が可能になる。 ネットワークの拠点構築 多様性をもったゲノム情報の取得 高速で高精度な多変量解析技術の進展 	<ul style="list-style-type: none"> コンピュータ健康支援システムの普及 診断支援に活用 	<ul style="list-style-type: none"> 個別化された健康管理手法の確立 	
標識法、標識物質、可視化	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光発光感度(ng) ・BKGの抑制剤が一部開発されている(MPCホリマー)。 ・病理標本のテレメディスン化が一部実施され 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光発光の感度UP (→fg) 	<ul style="list-style-type: none"> 標識体及び検出機器の改良により感度が更に向上し、複数の標識体が同時に使用可能(100マーカー)となりコストダウンする。 病理標本の画像解析システムが一般化 		
非標識解析技術	<ul style="list-style-type: none"> ・安定同位体による解析が研究レベルで使用されている。 	<ul style="list-style-type: none"> MS・MSの解析能があがり感度向上する。 	<ul style="list-style-type: none"> ベンチトップMS・MSの開発により普及 定性的検査から定量的検査へ 		
検体採取、検体処理	<ul style="list-style-type: none"> 侵襲度の低い検体採取技術の開発 汗、呼吸、尿、唾液などの侵襲度の低い検体の利用技術 抽出方法が施設・項目により異なる。フィルター上でDNA保存(標準化迄至っていない) 	<ul style="list-style-type: none"> DNA・RNA抽出の標準化 保存・輸送技術の一般化 	<ul style="list-style-type: none"> 保管する上での倫理規定を整備 		
共通基盤	<ul style="list-style-type: none"> バイオリソース (cDNA、微生物、動植物、モデル生物等) データベース整備(ゲノム、cDNA、SNP、ハプロタイプ、発現頻度、細胞内局在等の情報の統合化) 				

※「技術進捗」中の各枠の色は、「具体的効果」の「画期的な医薬品・診断技術の開発」(青)、「医薬品開発の効率化」(黄色)、「QOLの向上」(ピンク)にそれぞれ対応。
 ※「技術進捗」中の四角囲いは技術を、丸囲いは技術開発による成果を示す。
 ※下線で表記しているものは、ナノバイオ分野と関係の深い研究開発・技術要素を意味する。



革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略の概要

<参考資料2-1>

平成19年4月

平成20年5月(改定)

平成21年2月(改定)

内閣府・文部科学省

◎厚生労働省・経済産業省

世界最高水準の医薬品・
医療機器を国民に提供

医薬品・医療機器産業を日
本の成長牽引役に

日本先行開発・日本参加の世界同時開発を目指した施策群

①研究資金の集中投入

- ・医薬品・医療機器関連予算の重点化・拡充
- ・産官学による重点開発領域等の調整組織の設置
- ・研究開発税制の充実・強化
- ・先端医療開発特区における研究資金の統合的・効率的な運用の方策の検討
- ・先端医療開発特区に関連する研究資金の重点化・集中配分等

②ベンチャー企業育成等

- ・研究資金の拡充
- ・施設や機器の共用化等
- ・企業化支援体制の整備、OB人材の活用、相談窓口の充実等
- ・エンジェル税制の活用等に関する支援施策の拡充
- ・バイオベンチャーの国際展開支援の実施
- ・国民経済上重要な新技術の企業化開発の推進
- ・審査手数料の支援検討
- ・医療機器の部材提供を活性化する方策の検討

③臨床研究・治験環境の整備

- ・国際共同治験の推進
- ・国立高度専門医療センターを中心に産官学が密接に連携して臨床研究を進める「医療クラスター」の整備
- ・橋渡し研究拠点、再生医療拠点、臨床研究体制の整備
- ・医療クラスターを中心とした治験の拠点化・ネットワーク化・IT化
- ・医師や臨床試験を支援する人材の育成・確保
- ・医師等の臨床業績評価を向上させるための取組
- ・臨床研究の規制の適正化の推進
- ・中央IRB機能等を有し、高度な国際共同研究が実施可能なグローバルな臨床研究拠点の整備
- ・先端医療開発特区における研究開発側と規制担当との開発段階からの並行協議の場の設置

④アジアとの連携

- ・重要な疾病について共同研究推進
- ・東アジアで収集されたデータの活用方法の共同研究

⑤審査の迅速化・質の向上

- ・新薬の上市までの期間を2.5年間短縮(ドラッグ・ラグの解消)
- ・審査人員を倍増・質の向上(3年間で236人増員)
- ・承認審査の在り方や基準の明確化、GCPの運用改善
- ・全ての治験相談にタイムリーに対応できる体制の整備
- ・日米欧審査当局との間での共同治験相談の導入の協議
- ・新医療機器の承認までの期間を19ヶ月短縮(デバイス・ラグの解消)
- ・医療機器審査人員の増員・質の向上(5年間で69人増員)
- ・新医療機器・改良医療機器・後発医療機器の3トラック審査体制を導入し承認審査の合理化を促進
- ・医療機器の相談業務の質・量の向上
- ・医療機器GCPの運用改善

⑥イノベーションの適切な評価

薬価制度等における革新的な製品のより適切な評価等

⑦官民対話

関係省・研究機関・産業界の連携強化

定期的な官民対話の実施

平成21年度健康研究関係施策 148億円 (118億円)

<参考資料2-2>

平成21年度各省予算のうち、健康研究推進研究にかかるものの額

基礎研究成果等

国民への画期的治療薬・医療機器・医療技術の迅速な提供

スーパー特区による加速・推進

健康研究(橋渡し研究・臨床研究)

研究拠点や研究支援の強化 130億円(101億円)

○中核病院、拠点医療機関の強化

(厚)臨床研究基盤整備推進研究 21億円(15億円)

(厚)治験推進研究等 41億円(35億円)

(厚)グローバル臨床研究拠点整備事業 4億円(新規)

国立病院等/臨床研究・治験実施機関

(厚)治験拠点病院活性化事業 8億円(8億円)

○橋渡し研究支援機関の強化

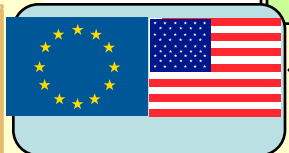
(文)橋渡し研究支援推進プログラム 24億円(18億円)

大学、大学病院等/研究・支援機関

○民間企業との一体的な研究開発

(経)基礎から臨床への橋渡し促進技術開発 33億円(26億円)

国際共同研究



ネットワーク医療機関



人材の確保 18億円(17億円)

(厚)医工連携研究基盤整備事業 2億円(2億円)

(文)大学病院連携型高度医療人養成推進事業 16億円(15億円)

ベンチャー等民間企業

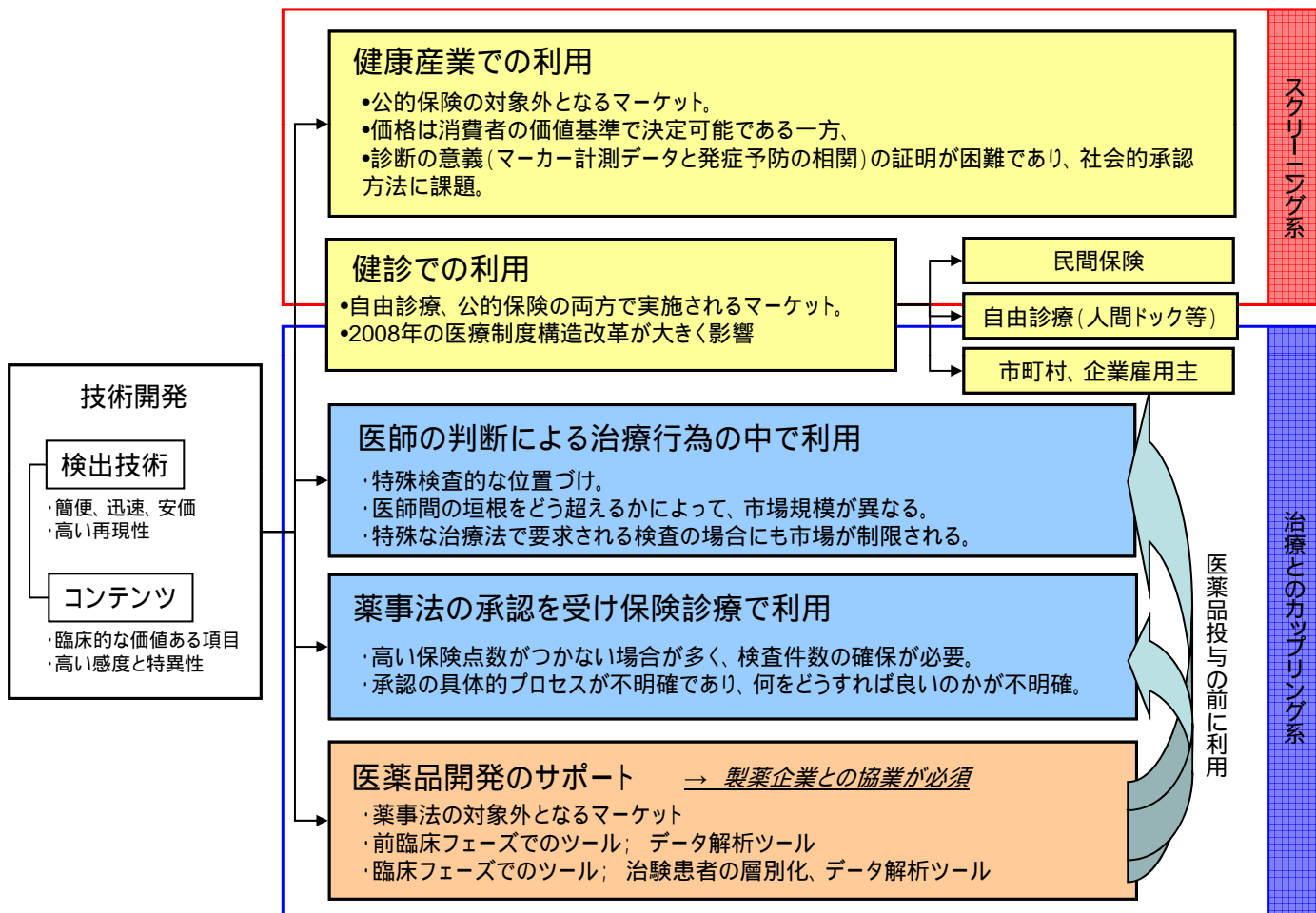
産業化 34億円(26億円)【再掲】

(経)健康安心イノベーションプログラムに係る研究開発事業 33億円(26億円)【再掲】
=(経)基礎から臨床への橋渡し促進技術開発

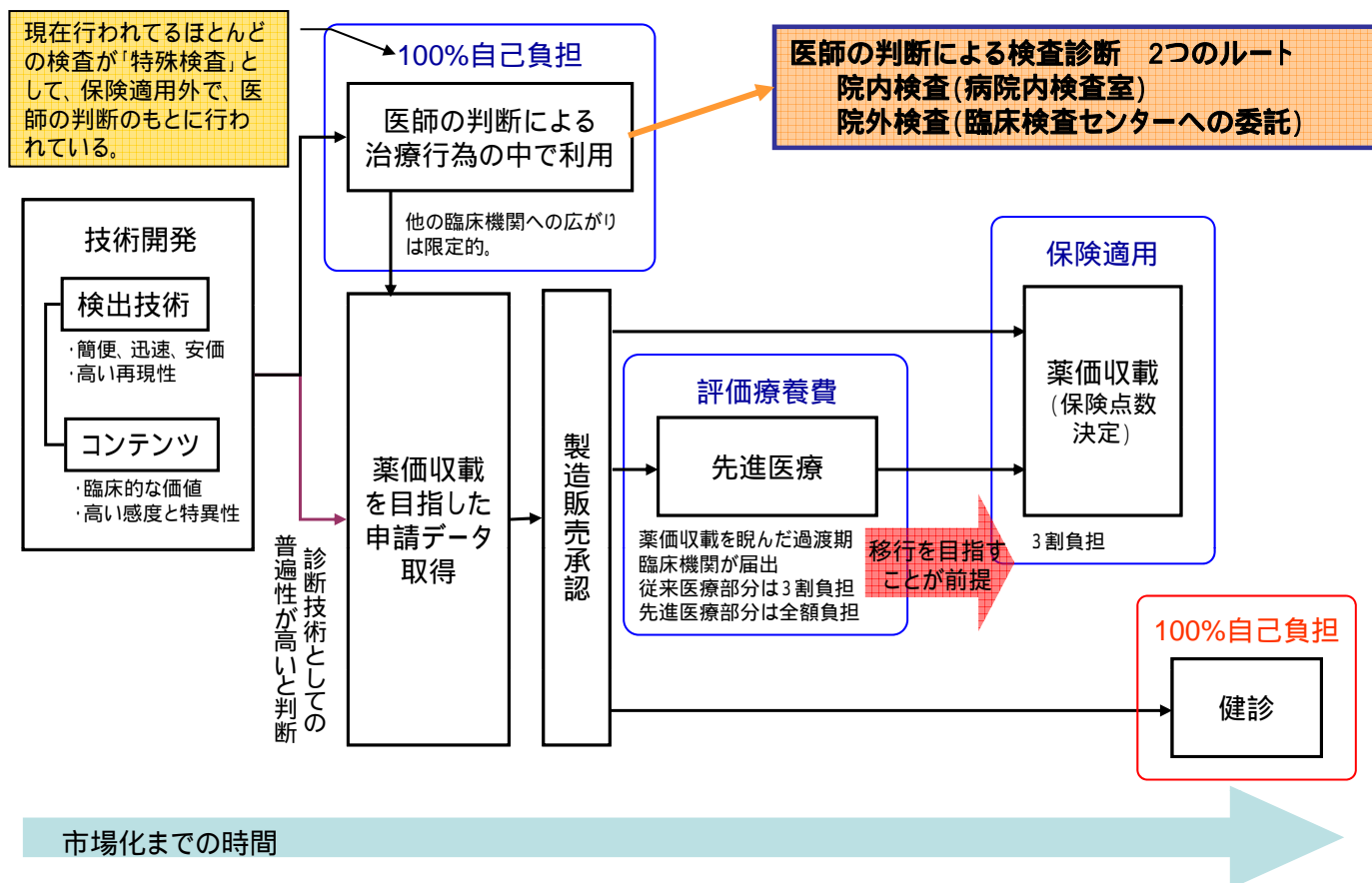
(厚)ベンチャー企業支援のための治験等相談事業 0.5億円(0.4億円)

※平成21年度健康研究概算要求方針に基づく施策のうち、□:科学技術振興費 □:科学技術振興費以外。()内は、昨年度予算額。

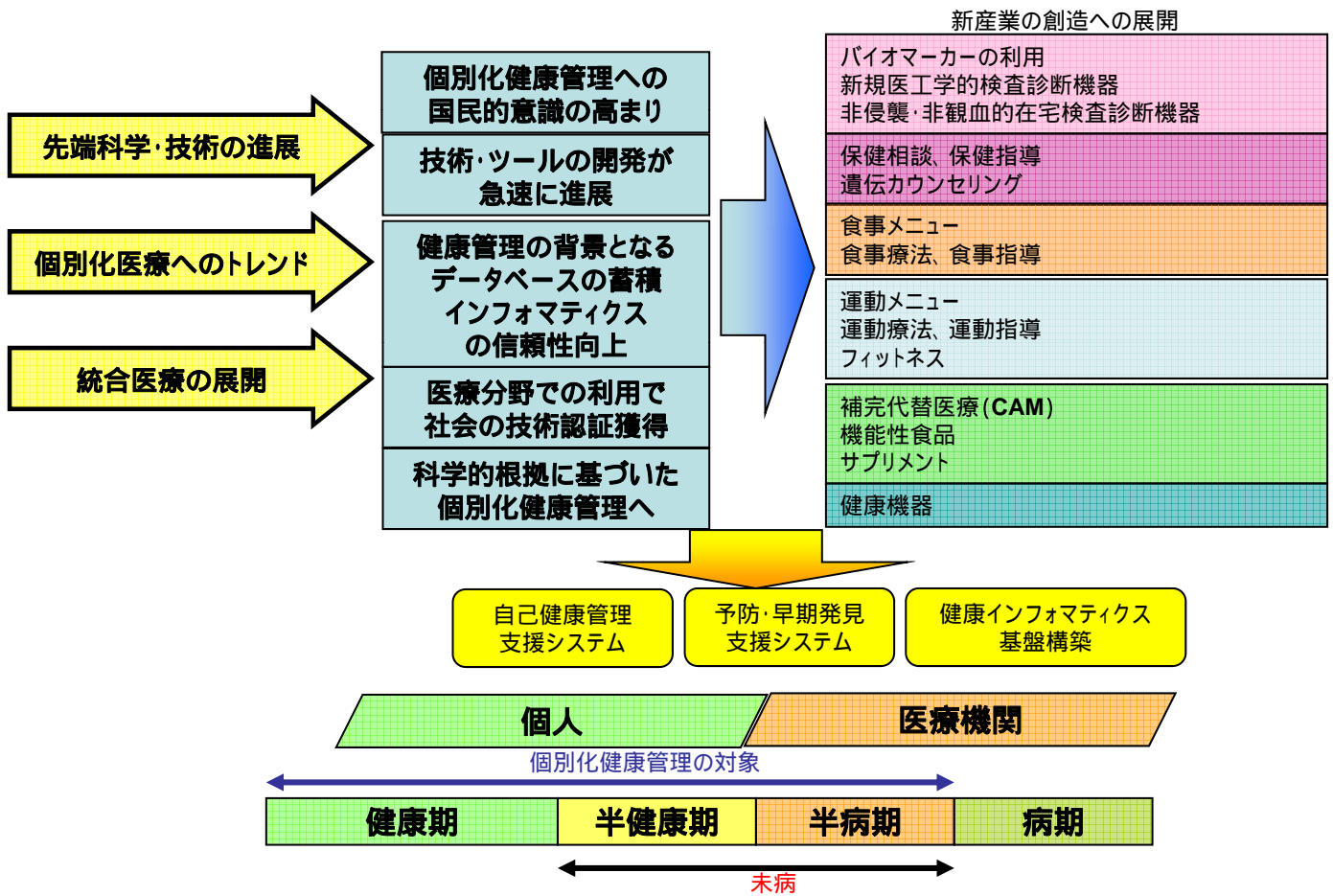
検査診断技術のビジネスエリア



医師による臨床現場での利用



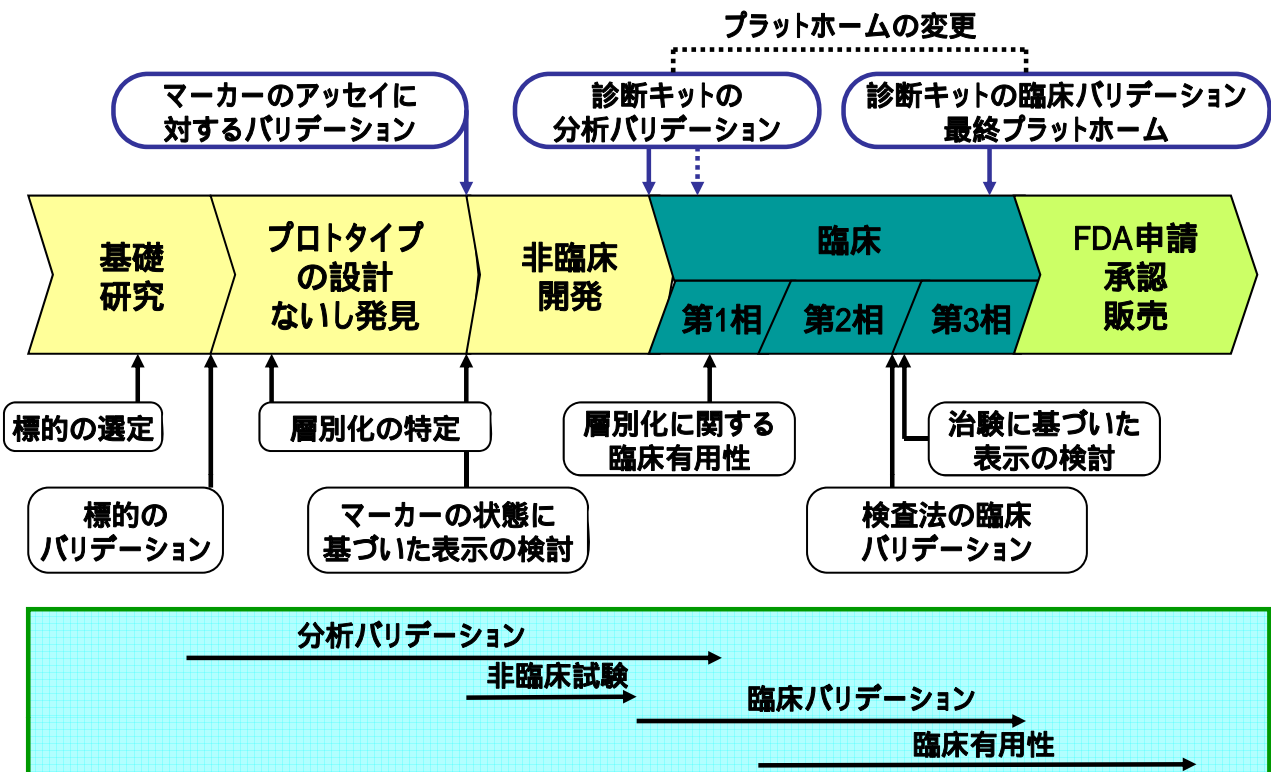
健康産業での利用



医薬品開発のサポート

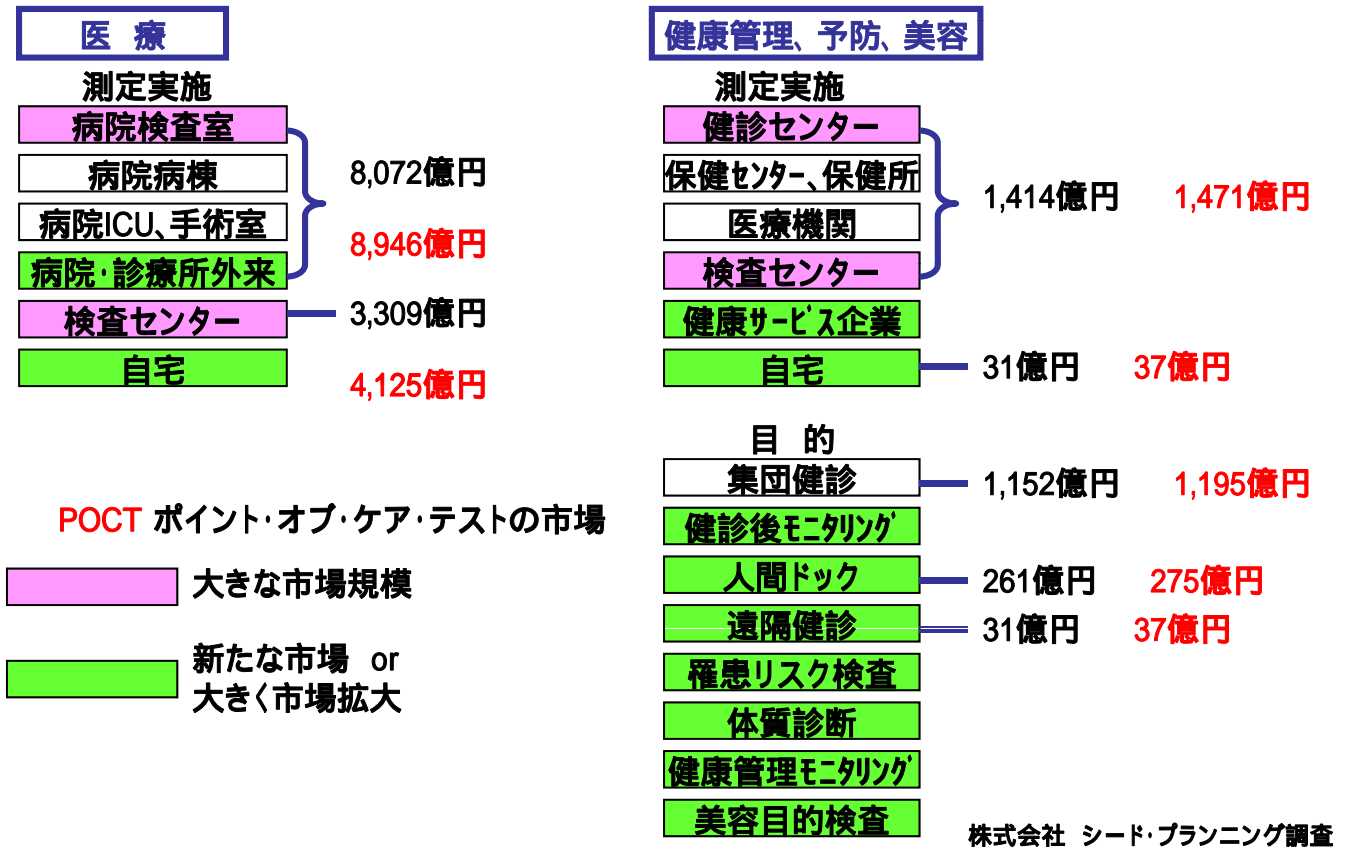
製薬企業との協業が基本

米国FDAが2005年4月のConcept Paperで提案している「医薬品と診断法の一体化開発」の考え方



検査診断市場の動向予測

(現在 10年後)



診断技術の利用場面

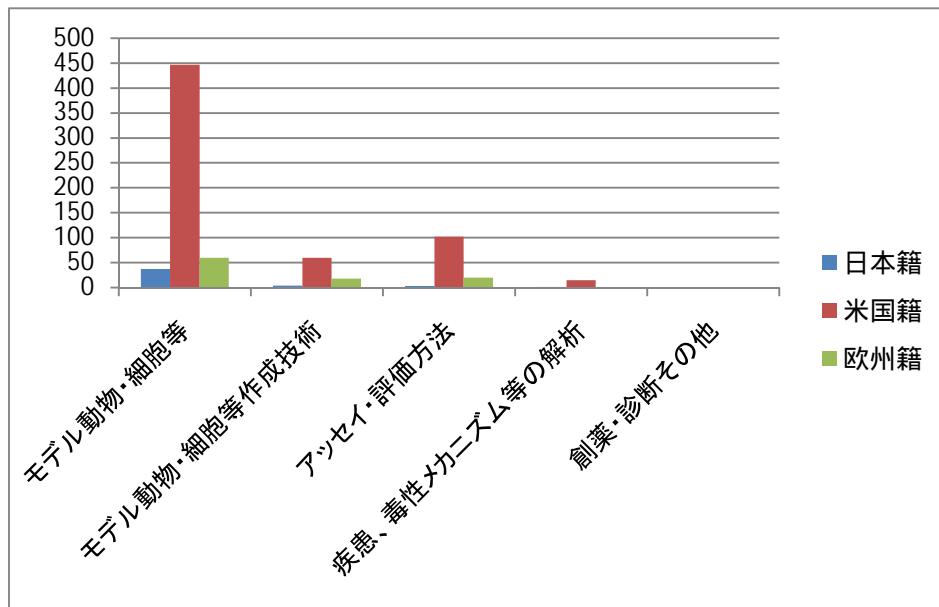
		診断の種類	試料及び測定対象	効果	診断技術	
家庭		罹患リスク診断	口内粘膜、血液など	多型	ゲノム塩基配列情報の多型による個人の体質を把握。ゲノムの多型情報及び疾患情報の相関を解明することが必要。	ゲノムシーケンス、インベーターアッセイ、DNAチップなど
		健康管理診断	汗、尿、唾液、呼吸、血液など	タンパク質、二次代謝産物など	罹患リスクに基づき個人毎のリスクに応じた健康管理をサポート。	イムノアッセイ、タンパク質チップなど
医療機関		健康診断 (早期発見)	血液、尿、呼吸など	mRNA タンパク質、糖鎖、プロファイリングデータ	日々の健康管理や、健康診断などの定期検診に、年齢に応じた診断項目が追加され、疾患の早期発見に向けたファーストスクリーニングをサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など
		確定診断 (治療方針決定のサポート)	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、糖鎖、ゲノム構造など	疾患関連遺伝子の発現プロファイル解析や、疾患特異的なタンパク質などの生体分子の検出、画像情報を用いて疾患の種別や性質を特定。臨床情報との連携で最適な治療方針の決定サポート。	PET、CT、MRIなどのモダリティ 組織染色、RT-PCR、質量分析技術、DNAチップ、タンパク質チップなど
医療機関での臨床用途	薬物投与前診断	投与量	口内粘膜、血液など	多型	肝臓の薬物代謝酵素の多型等に応じた用量決定による副作用回避。	ゲノムシーケンス、イムノアッセイ、DNAチップなど
		奏功性	疾患組織	タンパク質など	薬剤の送達や取り込み能力などのトランスポーターの多型による用量決定で副作用回避。	
	予後診断	疾患組織	血液	ターゲット分子、プロファイルデータ	薬が効くか効かないかを個人毎の病状や体質に応じて選択し、投与。	イムノアッセイ、組織染色、タンパク質チップなど
			血液	タンパク質、二次代謝産物など	治療効果や快復状態を診断し、適切な予後管理をサポート。	DNAチップ、イムノアッセイ、RT-PCR、質量分析装置など
医薬品開発から得られた知見を活用し、診断目的にマッチしたバイオマーカーを選択						
	医薬品の開発過程	血液、疾患組織	mRNA、タンパク質、プロファイリングデータ	開発中の新薬の薬理メカニズムに基づき、薬が効く患者を選択し、臨床試験を行う。	DNAチップ、質量分析装置、タンパク質チップなど	

創薬・診断分野の国際競争ポジション

～平成 19 年度特許出願動向調査報 幹細胞関連技術～

近年 iPS 細胞で話題になっている幹細胞関連技術について、米国への産業応用特許出願を国籍別にみると、創薬・診断分野では米国籍、欧州国籍の出願が圧倒的に多いことがわかる。我が国では今後、iPS 細胞を活用した創薬ビジネス・再生医療ビジネスの創出が期待されているが、産業化へのハードルは高く出遅れた形となっている。

図 幹細胞関連技術の創薬・診断分野における国籍別出願数（米国への出願）



1980 年～2005 年（優先権主張年）のデータをもとに作成

出典：平成 19 年度特許出願動向調査報告書 幹細胞関連技術



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

研究目的

背景、目的、必要性(政策的位置付け、市場ニーズ、技術ニーズ)

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、医薬品を迅速かつ安価に上市することが期待されている。

市場ニーズ(目的): 投入する研究開発が年々増加し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おり、このギャップを埋める技術が望まれている。

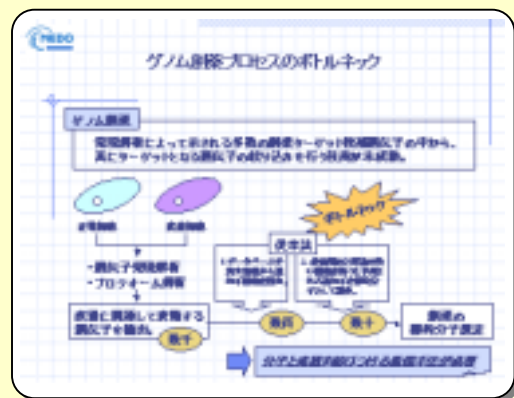
技術ニーズ: 正常細胞と疾患細胞の比較から導き出される変動遺伝子の中から、創薬ターゲットを高い信頼性で選別・同定を可能とする解析ツール。

プロジェクトの規模

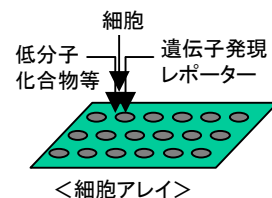
研究予算と研究期間(目安として)

平成17年度: 5億円(研究用モデル細胞との合算)、研究期間: 5年

その他関連図表(技術の一例)



①モニタリング技術



- 生きた細胞で連続測定
- 遺伝子等を高効率に細胞に導入

研究内容

研究開発課題(目的達成のための技術課題)

細胞モニタリング技術

DNAチップ解析の結果等から示される多数の変動遺伝子の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や遺伝子発現レポーター等を高効率で導入する技術。与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術の開発。

創薬ターゲット同定技術

細胞状態のリアルタイム解析によって得られる種々の情報を統合し、その中から必要な情報を引き出し、複数分子間の相互作用によるネットワーク情報として統合することによって、有望な創薬ターゲット遺伝子を高効率に同定する技術の開発。

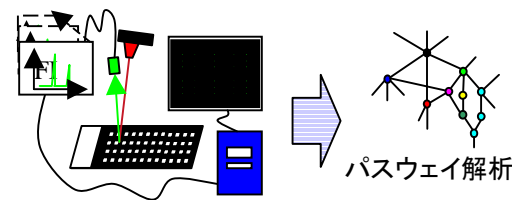
キーテクノロジー、ブレークスルーのポイント、オリジナリティ(課題を解決するためのポイントおよびその現状)

効率の高い遺伝子導入法や細胞の固定化技術、長時間の連続測定技術、高速・高感度解析技術
膨大に生み出されるデータから価値ある情報を取り出す情報処理技術

目標値(技術水準)とその条件および設定理由(根拠)

遺伝子と細胞表現型の相関関係をネットワーク情報として示すことによって、多数示される変動遺伝子群の中から、有望な創薬ターゲット遺伝子を高効率に同定する技術の確立。

②創薬ターゲット同定技術



- 遺伝子発現を長時間リアルタイムモニタリングを可能に
- 数千遺伝子の相関関係を解析可能に

ゲノム創薬、再生医療、テーラーメイド医療などの実現に寄与

「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）基本計画（案）」

に対するパブリックコメント募集の結果について

平成17年2月28日
NEDO技術開発機構
バイオテクノロジー・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間

平成17年2月14日～平成17年2月27日

2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞

計 0件

以上

2. 分科会における説明資料

次ページより、プロジェクト推進・実施者が、分科会においてプロジェクトを説明する際に使用した資料を示す。

「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解析」

(事後評価)

(2005年度～2009年度 5年間)

プロジェクトの概要 (公開)

NEDO技術開発機構
バイオテクノロジー／医療技術開発技術部

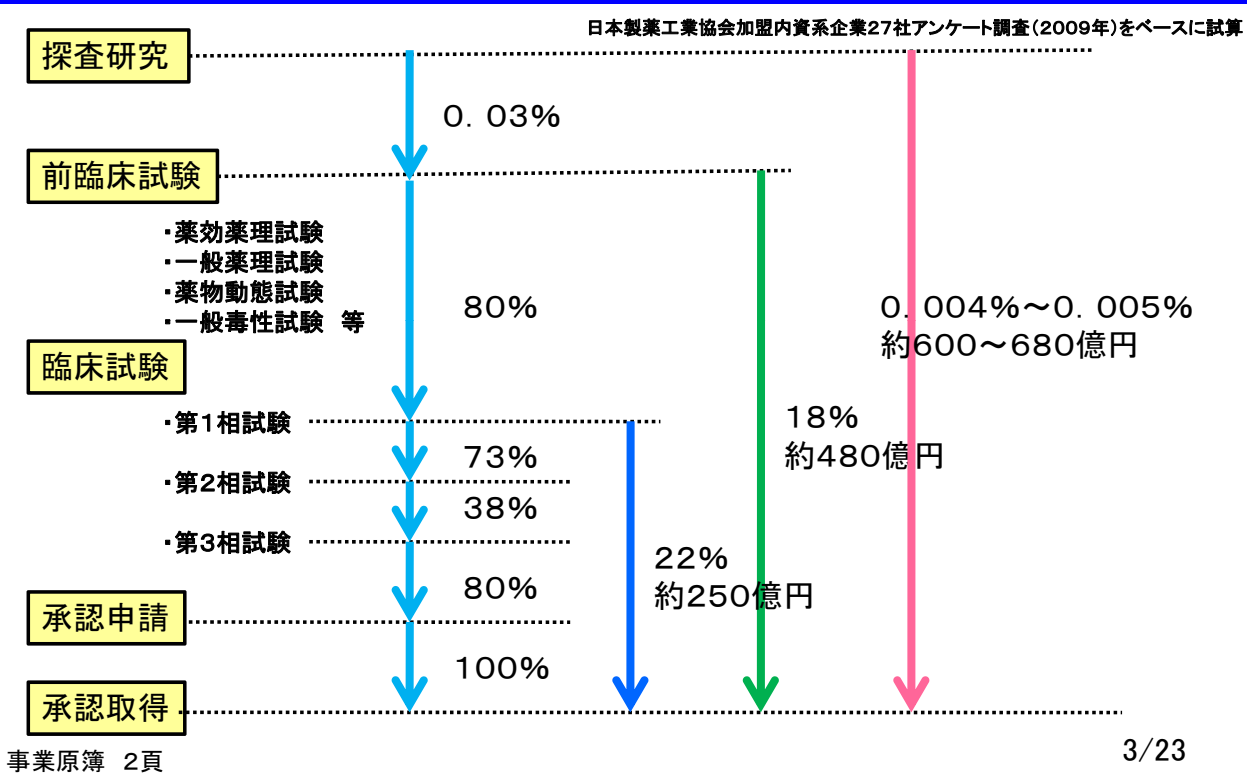
2010年 8月 6日

1/23

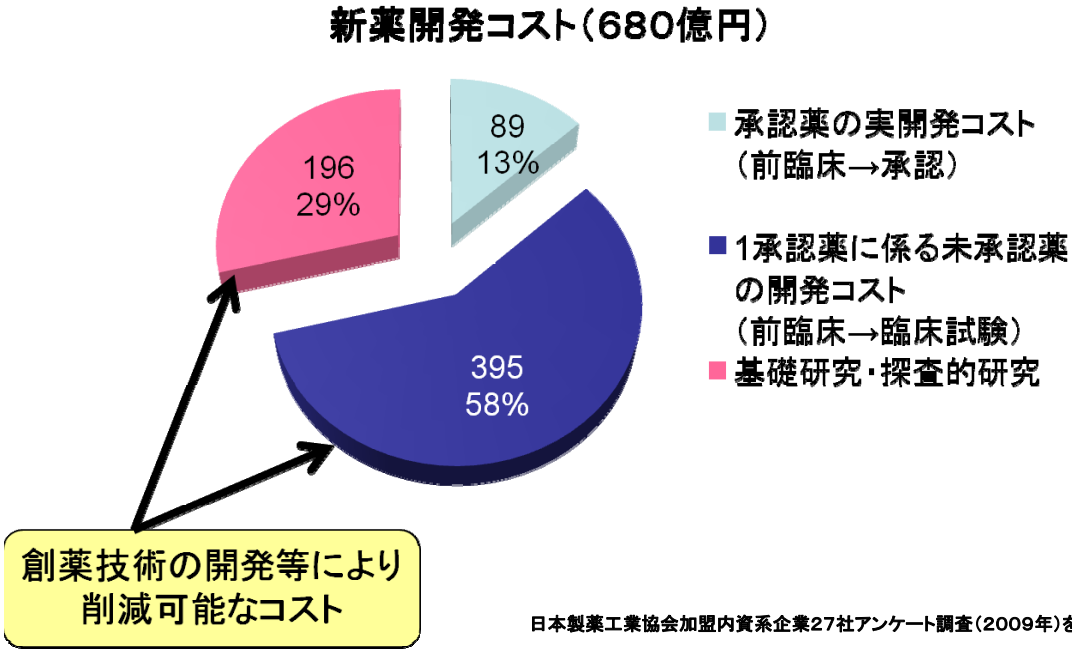
公開

I. 事業の位置づけ・必要性

社会的背景(医薬品開発の成功確率とコスト)



社会的背景(医薬品開発コストの内訳)



事業の背景・概要

- 創薬コストを軽減することで、安価で、しかも有用性の高い医薬品を迅速に上市することが求められている
- ゲノム創薬は期待され、多額な研究開発費投入されたが、上市される医薬品数はむしろ減少している
- 原因は、創薬ターゲットとなる遺伝子の絞り込み技術が未成熟なことの一因がある
- 遺伝子の絞り込み技術開発には、分子生物学的知識だけに依存しない、より高次の技術開発が求められている

事業の目的

- 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。
- 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。

健康安心イノベーションプログラム基本計画

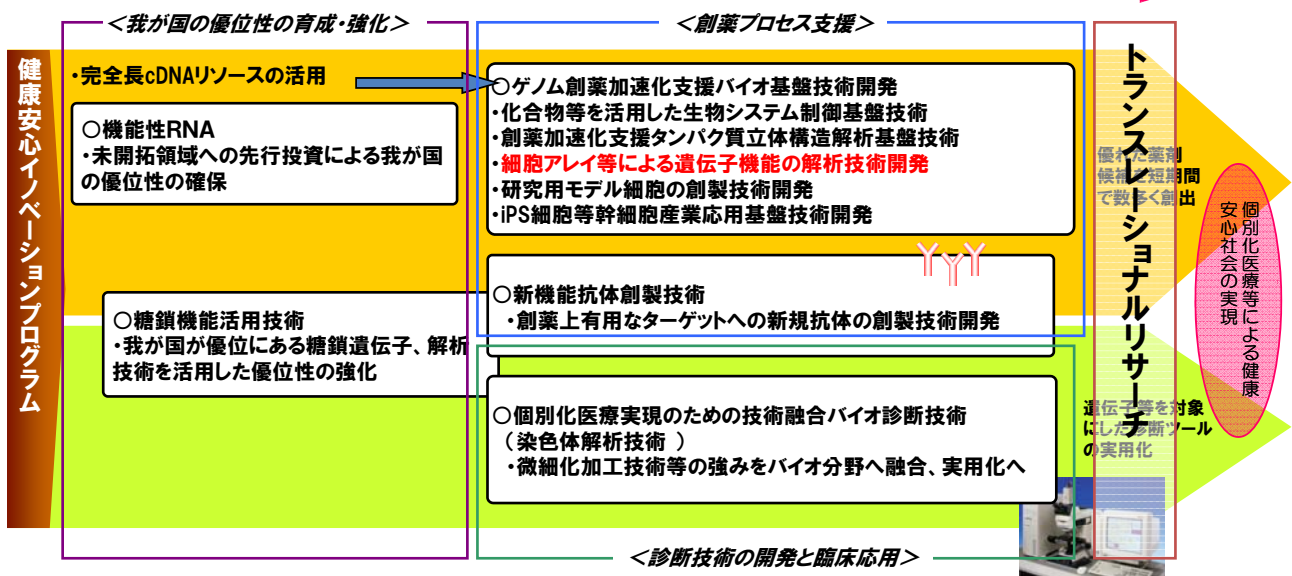
今後、世界に類を見ない少子高齢化が進展する我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会を実現することは喫緊の課題である。具体的には、個の医療を通じて健康寿命の延伸、QOL(Quality of Life: 生活の質)の向上を図ることが求められている。

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

健康安心イノベーションプログラムにおける位置付け

- 創薬の技術的ボトルネックを解決し、創薬プロセスの高度化・効率化を目指す創薬加速化支援技術開発を重点的に推進。コア技術を開発し、創薬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。

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



NEDO関与の必要性

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開発が必要



医学、薬学、生物学、工学、情報等各技術の効率的な融合

波及効果:

- 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、薬漬け医療の改善
- ③これまで治療が困難であった再発ガン、転移ガン、難治性固形ガンの治療を可能にする、
- ④既存薬の薬効メカニズムの解明による新しい併用療法の開発

事業への期待

本プロジェクトによる新しい創薬基盤技術の確立により、

1. 新しいメカニズムに基づく有用性(有効性、安全性)の高い新規医薬品の開発
2. 開発効率(成功確率)の向上による開発コストの低減
⇒医療費の抑制
3. 難治性の癌に対する新たな治療法(既存薬の併用等)の開発
4. 医薬品以外の化粧品や健康産業への波及効果

Ⅱ．研究マネージメントについて

11/23

事業の目標

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用い、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。

基本計画の内容(研究開発項目)

1. 細胞モニタリング技術開発

DNAチップ解析の結果等から示される多数の変動遺伝子の相互関係を解析するため、多数の細胞に同時に異なる遺伝子や遺伝子発現レポーター等を高効率で導入する技術を開発するとともに、与えた刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術の開発を行う。

2. 細胞情報解析技術開発

細胞状態のモニタリング解析によって得られる種々の情報を整理・統合し、その中から必要な情報を引き出し、疾患と変動遺伝子の相関性を解析する技術の開発を行う。

3. 創薬ターゲット同定技術開発

開発した技術を活用し、有望な創薬ターゲット遺伝子を信頼性高く、高効率に同定可能な技術の開発を行う。

研究開発項目の内容

1. 細胞モニタリング技術開発:

- ・多数の細胞に同時に多数遺伝子・レポーター等を高効率で導入する技術
- ・刺激に対して細胞が示す反応の時系列計測を行う技術
- ・多数の変動遺伝子と細胞表現型の相互関係を解析

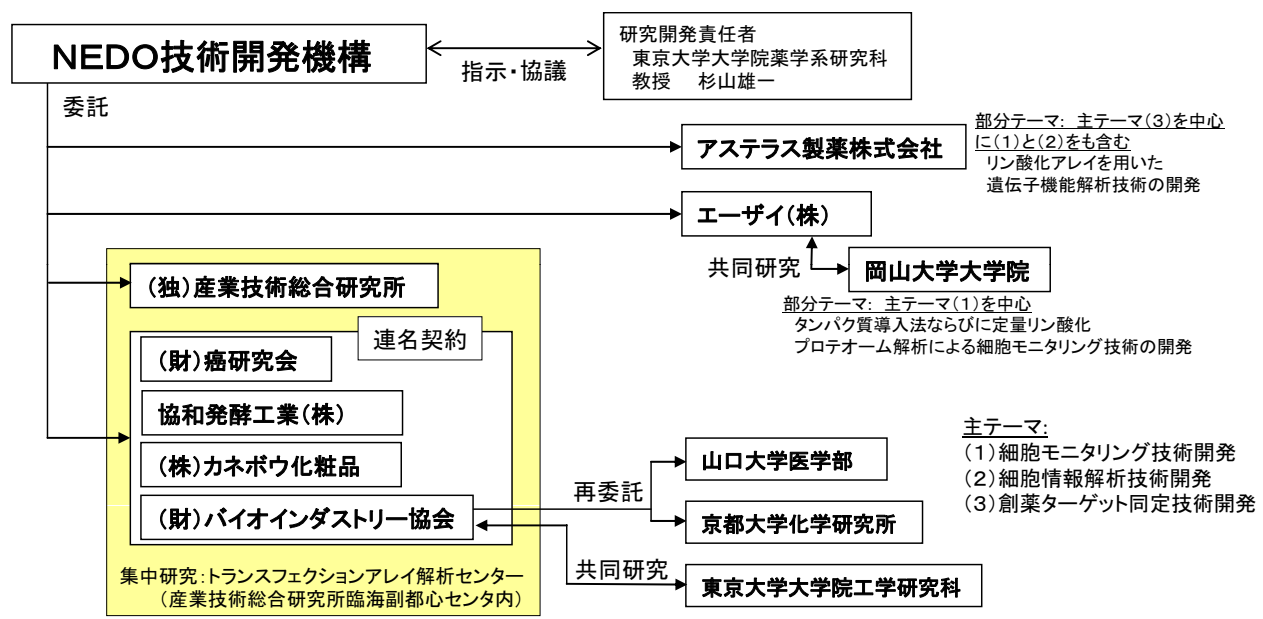
2. 細胞情報解析技術開発:

- ・細胞状態のモニタリング解析によって得られる情報を統合
- ・変動遺伝子の相関性の解析技術
- ・遺伝子パスウェイを解析する技術

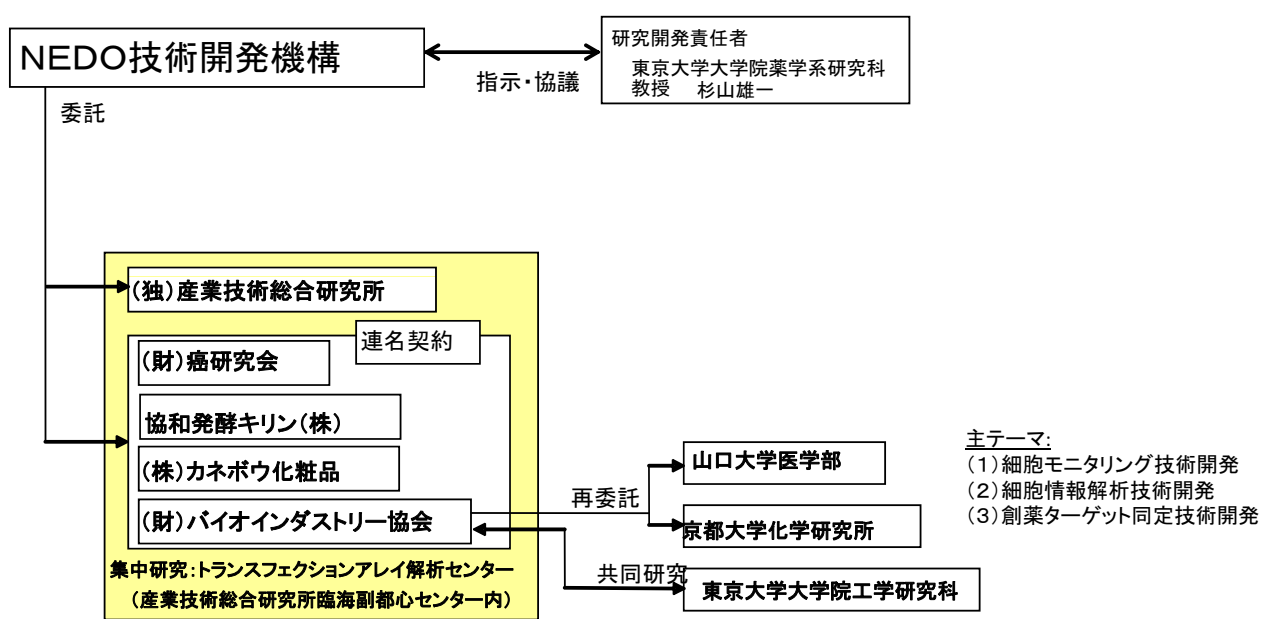
3. 創薬ターゲット同定技術開発:

- ・細胞モニタリング技術と細胞情報解析技術を活用して解析
- ・ネットワーク／パスウェイ情報として把握
- ・有望な創薬ターゲットを信頼性高く、高効率に絞り込む技術の開発

研究開発体制(平成17~19年)



研究開発体制(~21年)

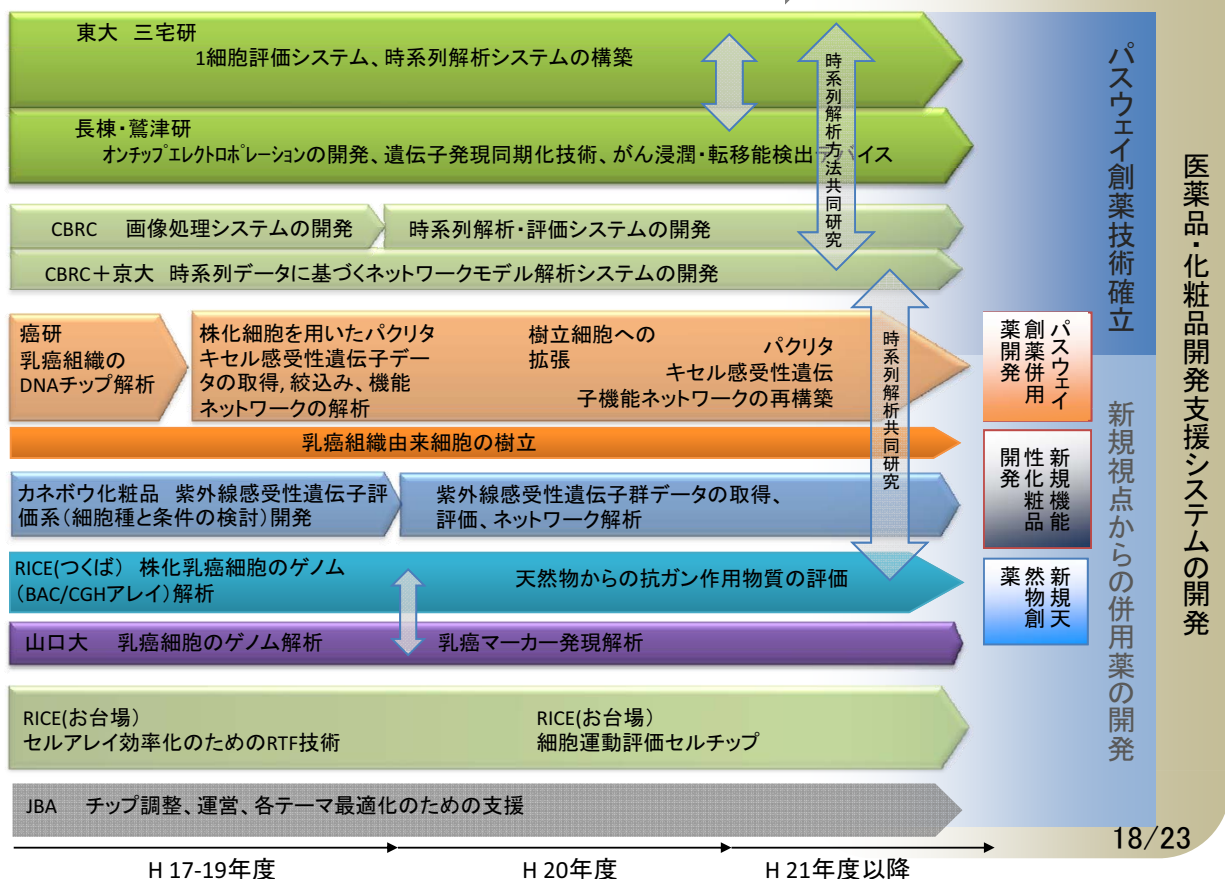


中間評価に対する対応(抜粋)

中間評価	中間評価に対する対応
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。	各実施施設ごとに実用化に向けた目標と課題を定めた 開発ロードマップ を作成した。
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。	開発ロードマップを基にJBA集中研を中心とした実施施設間の 研究協力体制 を再構築して、研究開発を推進した。

開発ロードマップ(JBA・産総研グループ)

パスイエイ創薬へのパラダイム転換 公開



研究協力体制



研究開発の運営管理

研究会合名	
研究推進委員会	9回(年2回)
研究推進委員会 小委員会(検討会)	3回
プロジェクト推進会議	13回
ワークショップ	1回(H19年5月31日)
バイオジャパン展示	2回(バイオジャパン2006、2009)

プロジェクト予算(実績)

(単位:百万円)

年度	H17年度	H18年度	H19年度	H20年度	H21年度	合計
一般会計	306	431	366	246	249	1,598

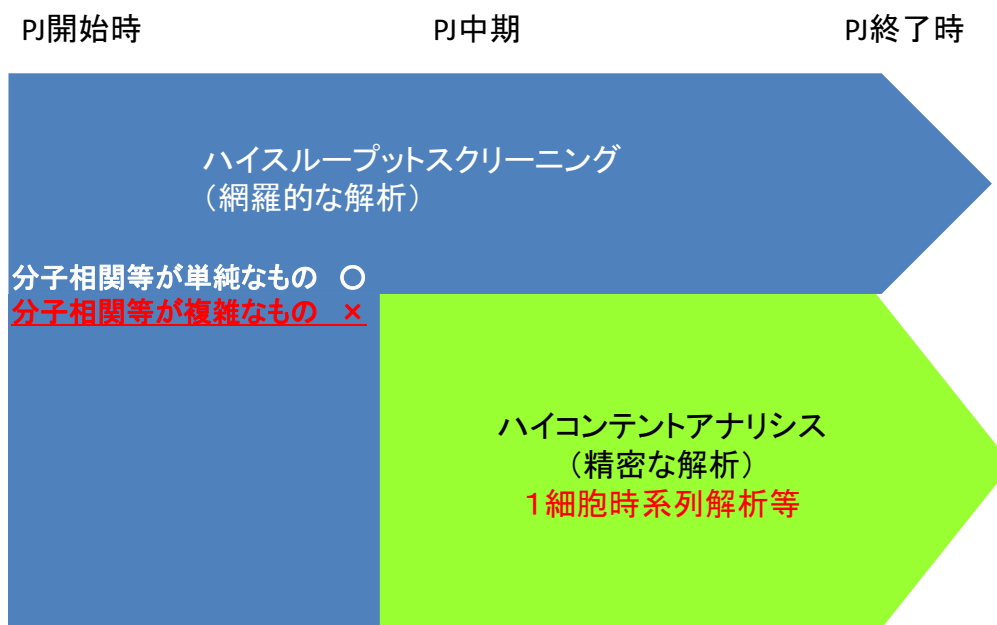
予算配分(合計)

実施施設	研究開発費合計
産業技術総合研究所	322(20.2%)
癌研究会	150(9.4%)
協和発酵キリン	8(0.5%)
カネボウ化粧品	42(2.6%)
日本バイオインダストリー協会 (集中研、東大、山口大、京大)	892(55.8%)
アステラス製薬	88(5.5%)
エーザイ	96(6.0%)

事業原簿 ii 頁

21/23

情勢変化への対応



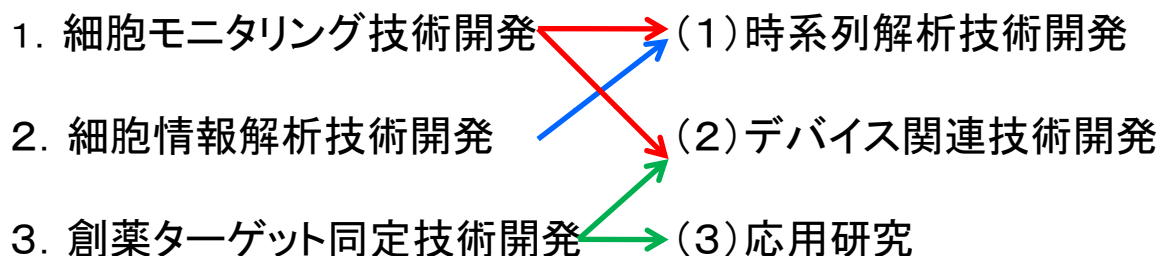
事業原簿 iii、11頁

22/23

研究開発項目と研究成果の関係

研究開発項目

研究成果



プログラム名 健康安心プログラム

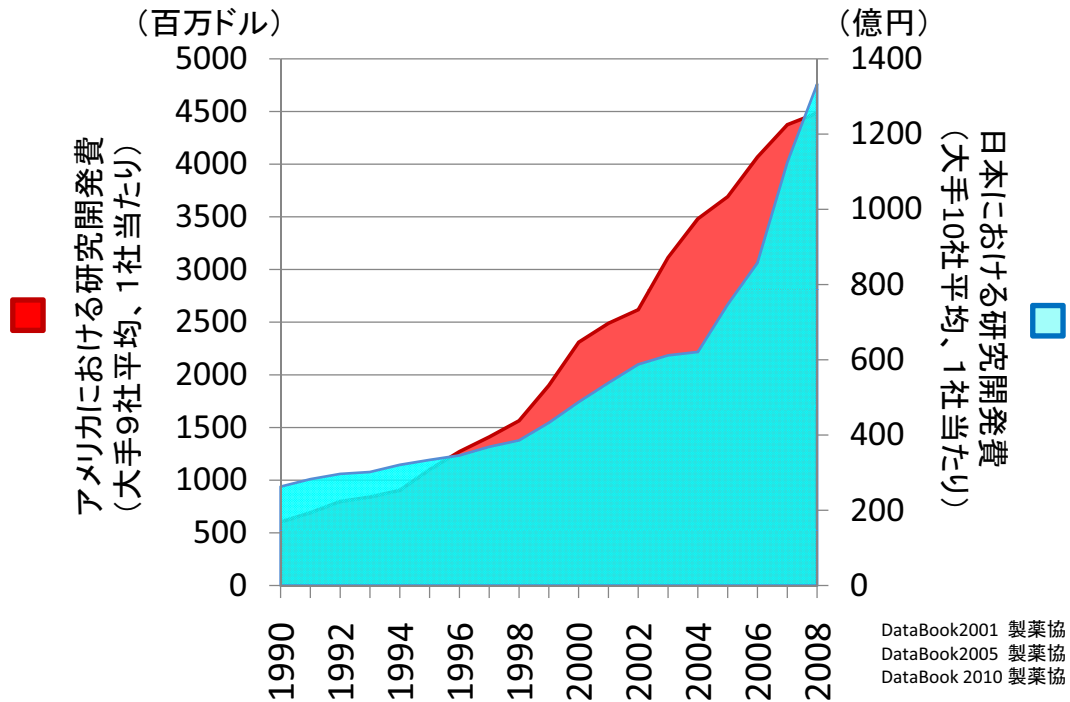
(中項目)

細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

リーダー 杉山雄一
東京大学大学院・薬学研究科

研究開発コストの増加

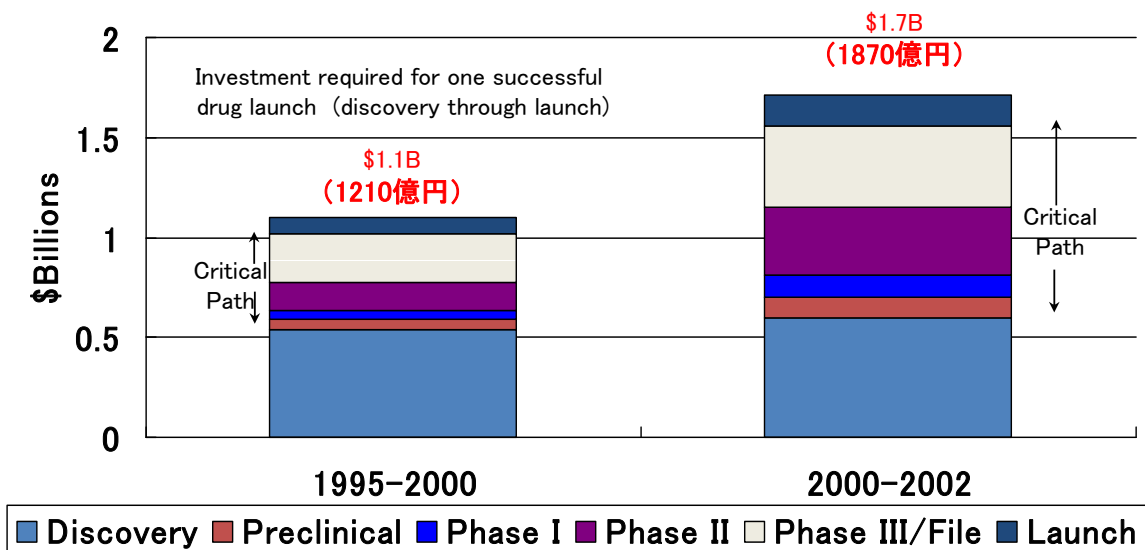
公開



2 / 11

一上市品あたりの投資額は上昇している。

公開

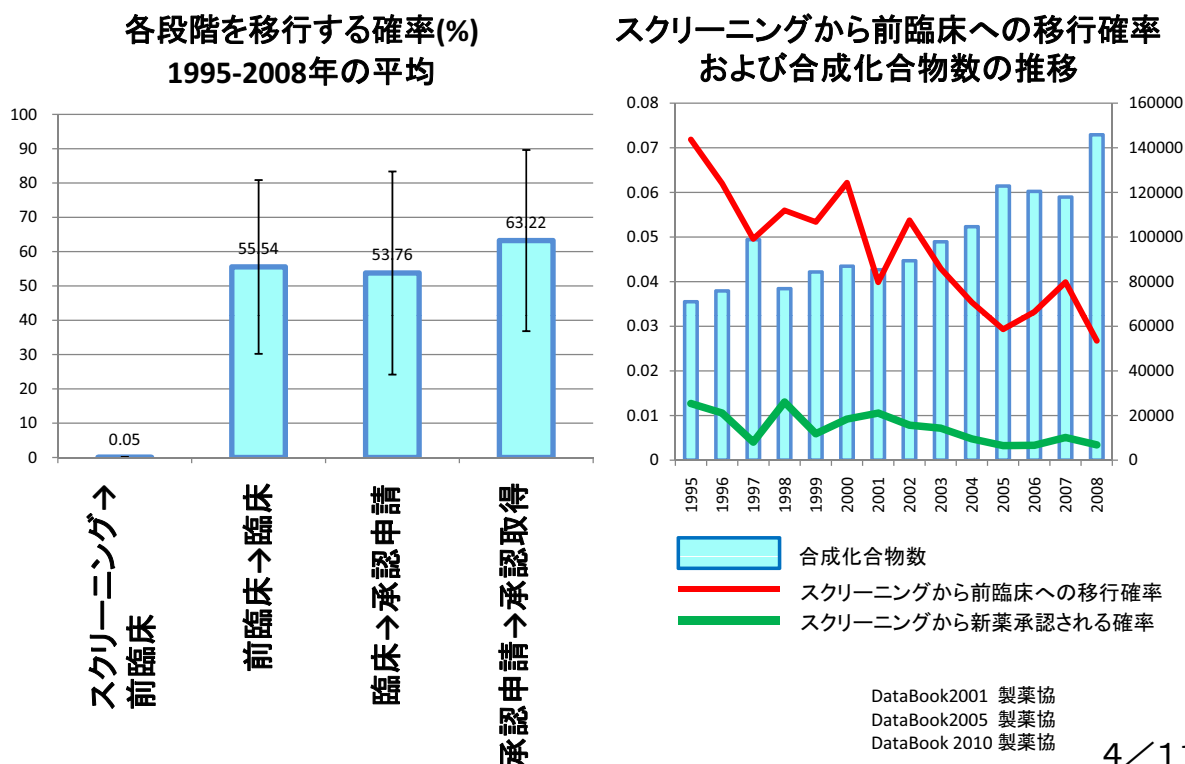


FDA: White Paper March 2004

3 / 11

開発効率の推移

公開



4 / 11

分子標的療法の課題

公開

2009 FDA drug approvals

Nature Rev Drug Discovery
2010. Feb

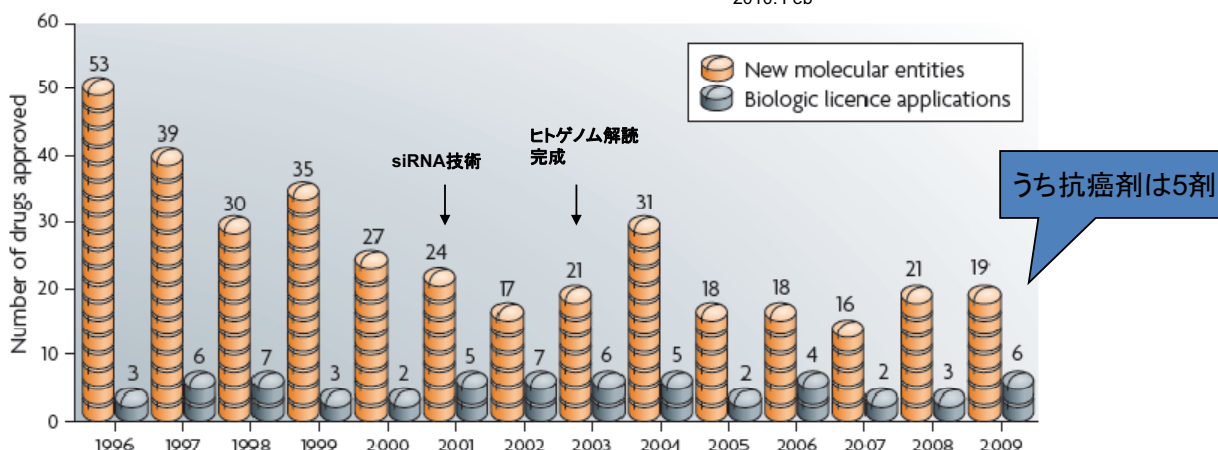


Figure 1 | FDA drug approvals. New molecular entities and biologic licence applications approved by the US FDA's Center for Drug Evaluation and Research by year.

分子標的、ゲノム創薬の創薬効率は必ずしも上がっていない。

5 / 11

次世代創薬技術の必要性

公開

- 創薬開発費用は増加の一途を辿っている。
- 新薬承認はスクリーニングの段階が最も低くその効率は年々減少傾向である。
- 候補化合物数は年々上昇している。



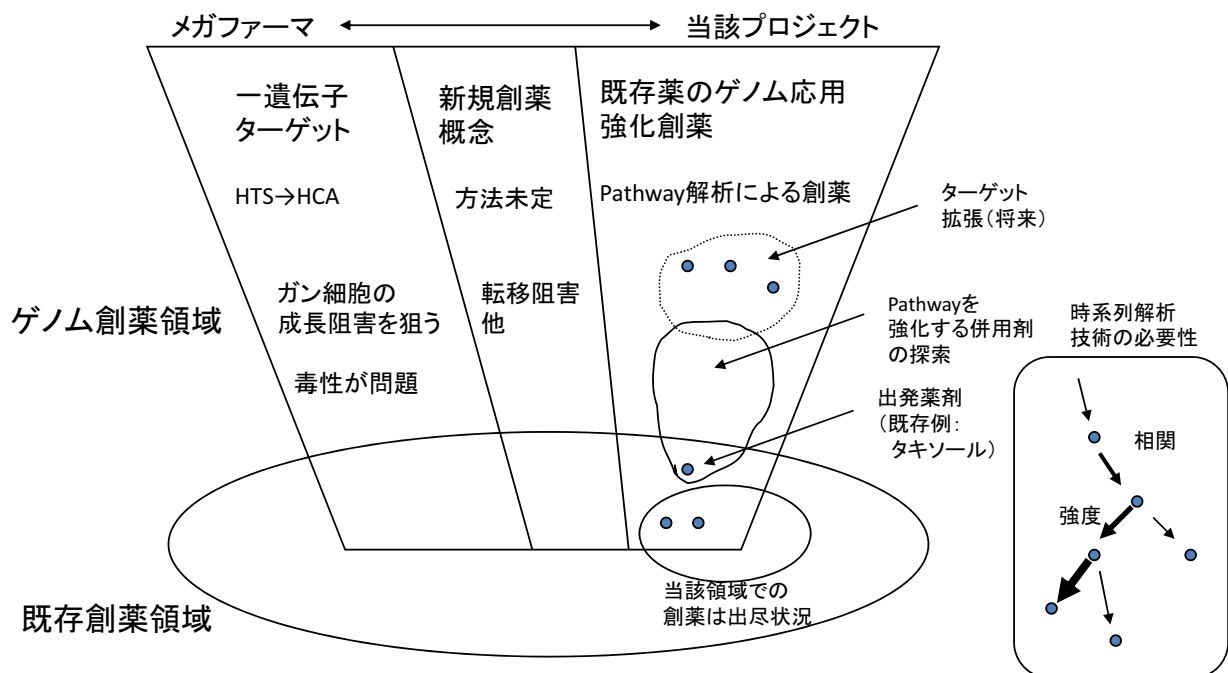
- 原因は、創薬開発方法(ターゲットをどのように定めるかなど)についての考え方が確立していないことにある
- 絨毯爆撃的方法は効率が悪い(上市効率の低さが示している)
- 細胞や遺伝子の性質を深く理解した新たな創薬技術が必要である。本プロジェクトでは遺伝子間の相互作用をパスウェイとして纏めて把握する方法を拓く

(但し、パスウェイは複雑系であることに留意)

6/11

ゲノム創薬の方法と当該プロジェクトの特徴

公開



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。



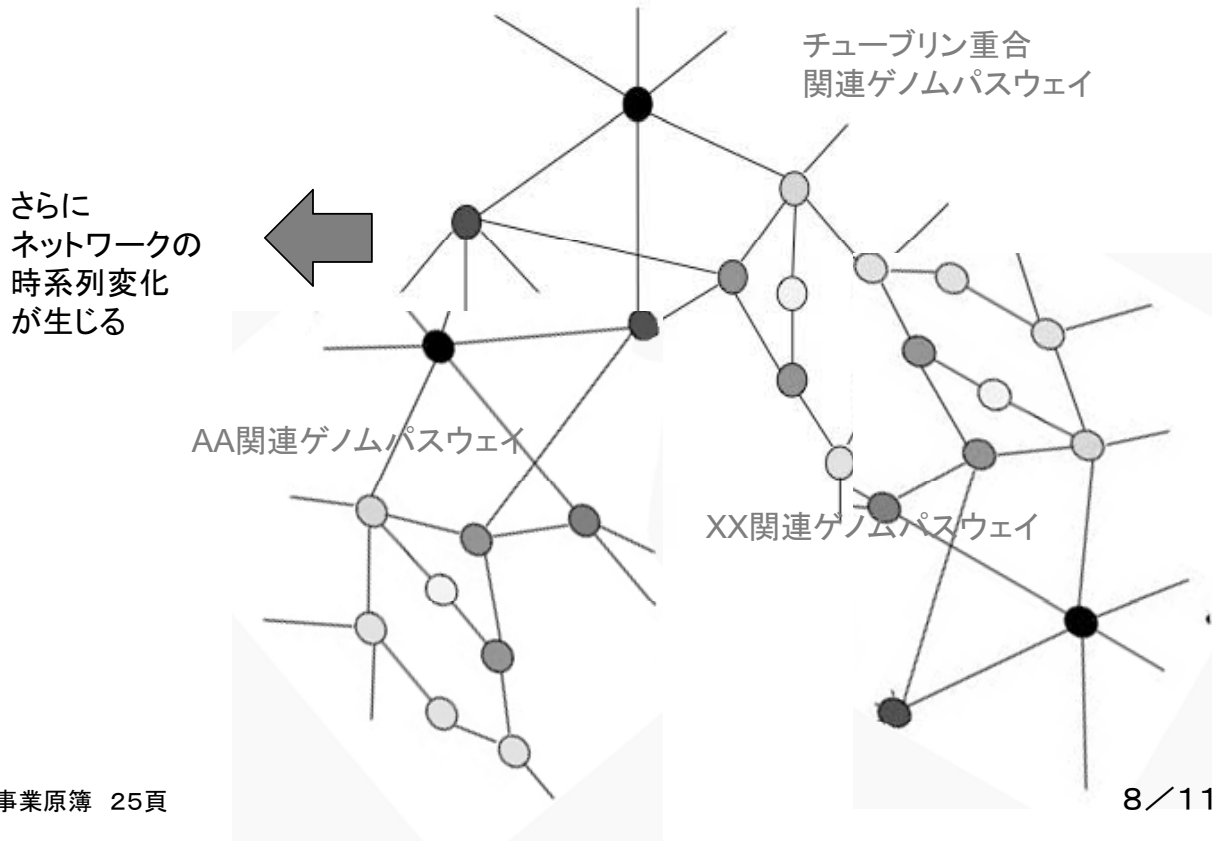
N次元要素(遺伝子、パスウェイ、時間)からなる状態

多角的な解析による高次元細胞像の理解

7/11

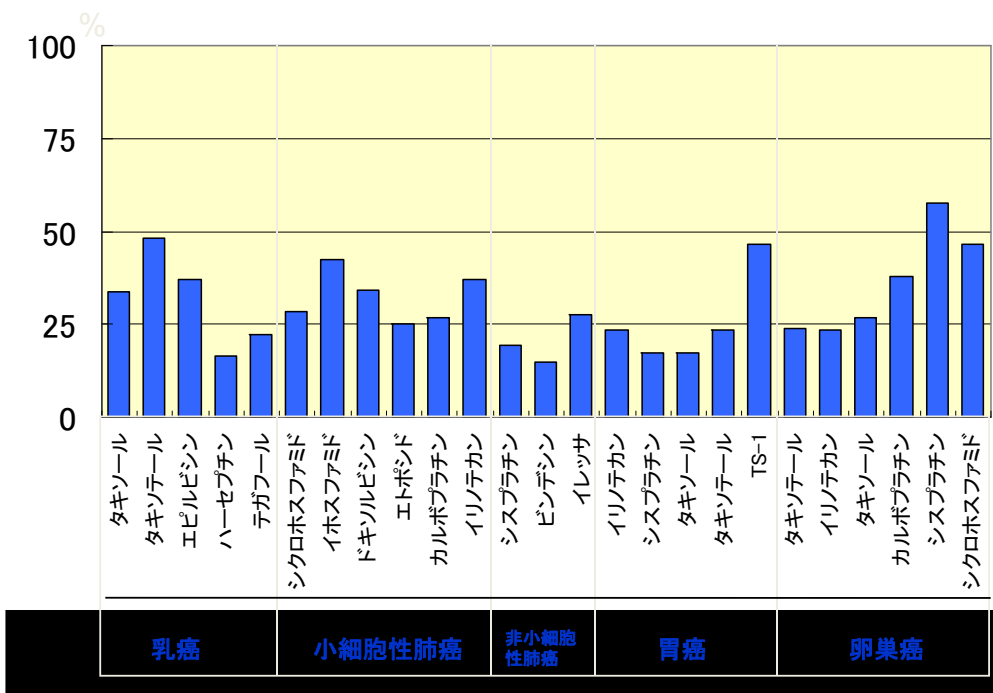
遺伝子ネットワークの解析技術

公開



各種抗癌剤の奏効率

公開



既知薬剤の組み合わせも予測が難しい。

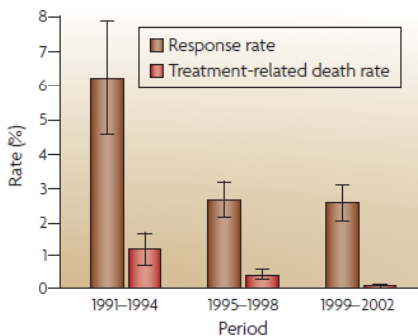
Table: Phase III trials of targeted agents combined with standard cancer treatments

Agent	Cancer	Chemotherapy		Outcome
		Concurrent administration	Preclinical support for combination?	
Gefitinib	Lung (two trials)	Y	Y	Failed (no difference in RR and OS)
Erlotinib	Lung (two trials)	Y	Y	Failed (no difference in RR and OS)
	Pancreas	Y	Y	Improved survival
Trastuzumab	Breast/HER2+	Y	Y	Improved survival
Bevacizumab	Colon (2 trials)	Y	Y	Improved survival
	Breast: first line	Y	Y	Improved survival with paclitaxel
	Breast: second/third line	Y	Y	Failed (improved RR but no difference in PFS)
	Lung	Y	Y	Improved survival
Oblimersen	Melanoma	Y	?	Failed to improve OS
Cetuximab	Head and neck	Y	Y	Failed (improved RR but no statistically significant difference in PFS)
	Head and neck		Radiation Y	Improved survival

OS, overall survival; PFS, progression-free survival; RR, response rate.

J. E. Dancey & H. X. Chen, Nature Rev. Drug Discovery 5, 649 (2006)

分子標的療法の理想と現実



NATURE REVIEWS | DRUG DISCOVERY
VOLUME 6 | FEBRUARY 2007

	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	Bevacizumab VEGF
	Cape citabine	Cetuximab EGFR
	Oxaliplatin	Panitumumab EGFR
乳癌	Docetaxel, Paclitaxel	Trastuzumab Her2
	Doxorubicin, Epirubicine	Lapatinib Her2
	Cyclophosphamide	
	Fulvestrant	
	Gemcitabine	
	Cape citabine	
	Vinorelbine	
非小細胞肺癌	Cisplatin, Carboplatin	Bevacizumab VEGF
	Vinorelbine	Cetuximab EGFR
	Etoposide	Erlotinib EGFR
	Docetaxel, Paclitaxel	
	Gemcitabine	
	Vinblastine	
	Pemetrexed	
	Irinotecan	
	Ifosfamide	
	Mitomycin	

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

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

2. 研究開発項目毎の成果

1/47

公開

プログラム名 健康安心イノベーションプログラム

(中項目)細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

リーダー 杉山雄一
東京大学大学院・薬学研究科

サブリーダー 三宅 淳
東京大学大学院・工学研究科・バイオエンジニアリング専攻
(現)大阪大学大学院・基礎工学研究科・機能創成専攻

2/47

細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発

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。
<主に第2章>

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<第2章>、
実際の創薬ターゲット遺伝子の探索に用い、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<第2章、第4章>、
産業上有用な解析ツールとして完成させる。<第3章、第4章>

注)「細胞アレイ等」=ヒト細胞を用いた技術の総称として用いている

3/47

成果

新規「パスウェイ創薬技術」を創出

4/47

成果：新規パスウェイ創薬技術の創出

【既存ゲノム創薬技術の問題点】

がん化に係わる遺伝子は多数相互関連しており、正疑判定＝絞り込みが困難であった(ハイスループット技術の限界、創薬効率低下)

【問題の解決＝プロジェクトの成果】

本プロジェクトでは遺伝子範囲の絞り込み方法と、遺伝子間の相互関係を解析する方法を開発した(新規「パスウェイ解析技術」の提示)

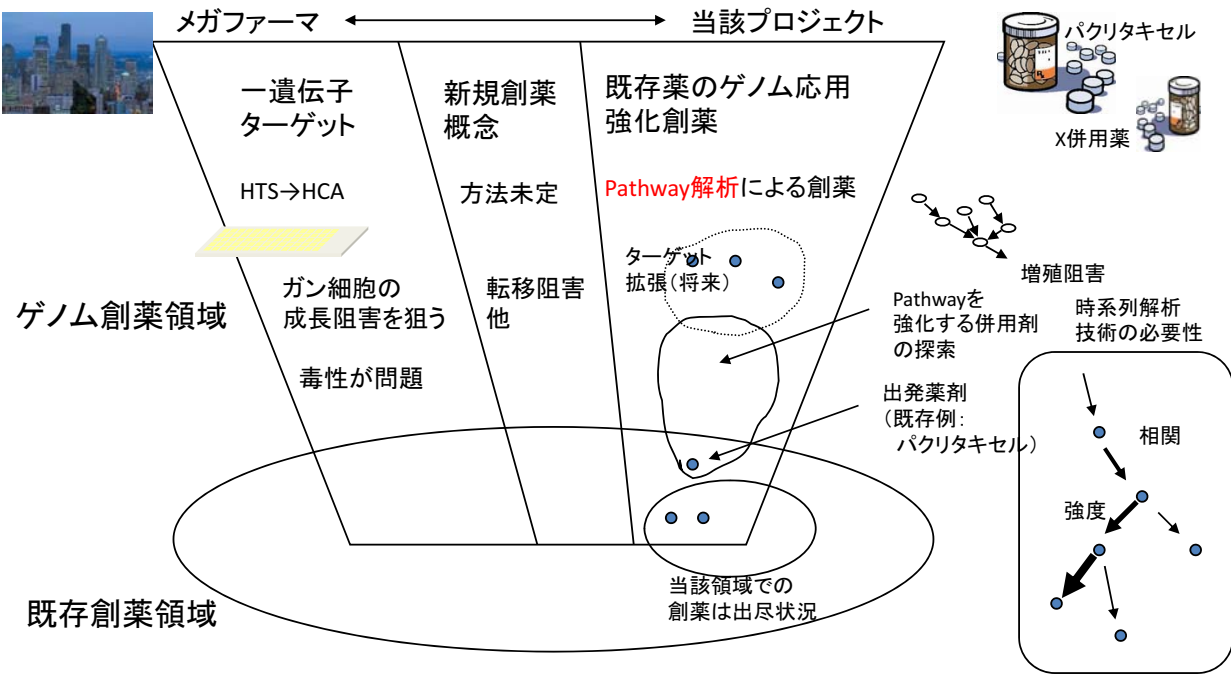
それにより、既存薬を補強し、高度な薬効を有する併用薬の開発が可能となった(パクリタキセルの高度化の道が開けた)

機能性化粧品の開発にも応用が開始されている(皮膚がん予防効果:企業での実用化研究開始)

がん転移メカニズム解明の手法を開発した(転移＝がん死第1原因)

資料04今後のゲノム創薬等と当該プロジェクト図 公開

ゲノム創薬の方法と当該プロジェクトの指向ポイント(案)



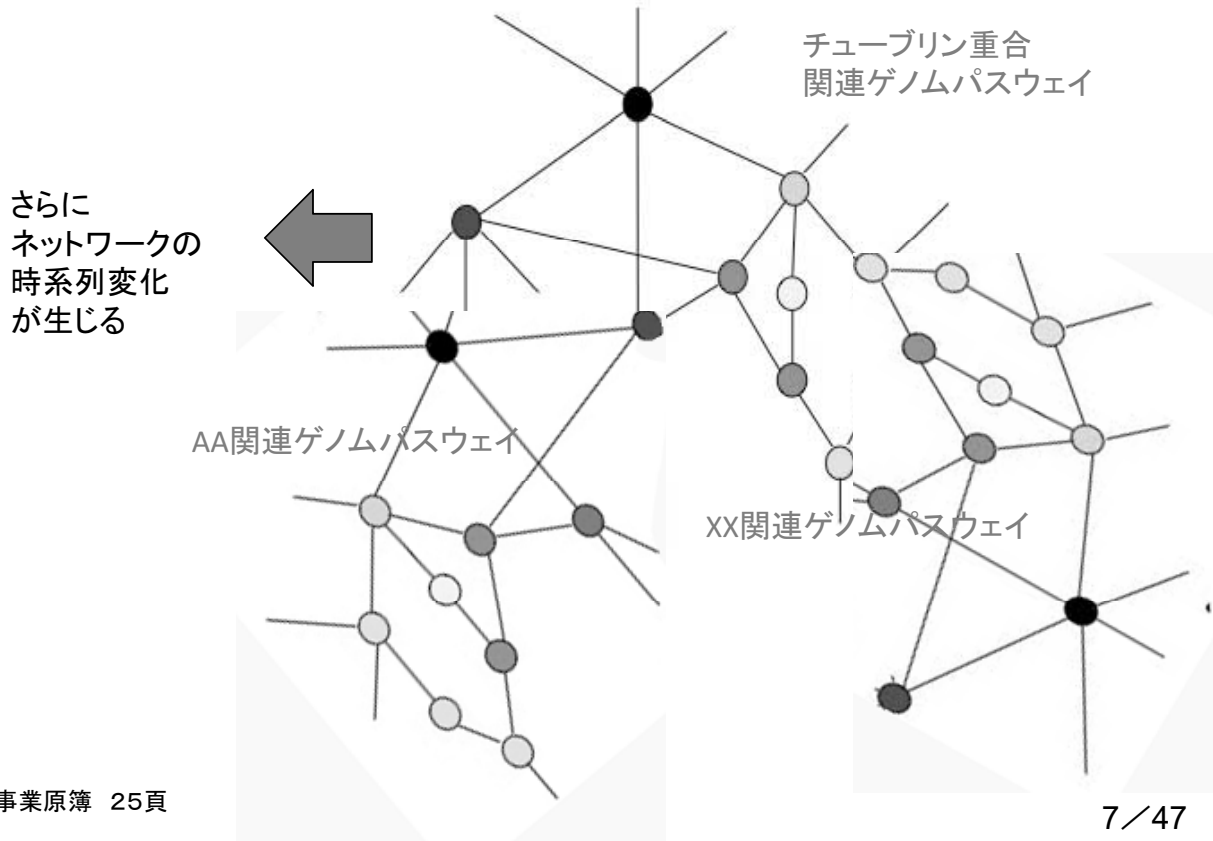
単純なネットワーク議論ではなく、細胞内の分子状態を統合的に表現する方法を探索する。細胞の物理的予測評価技術への発展を将来的に引き続き検討する。

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

遺伝子ネットワークの解析技術

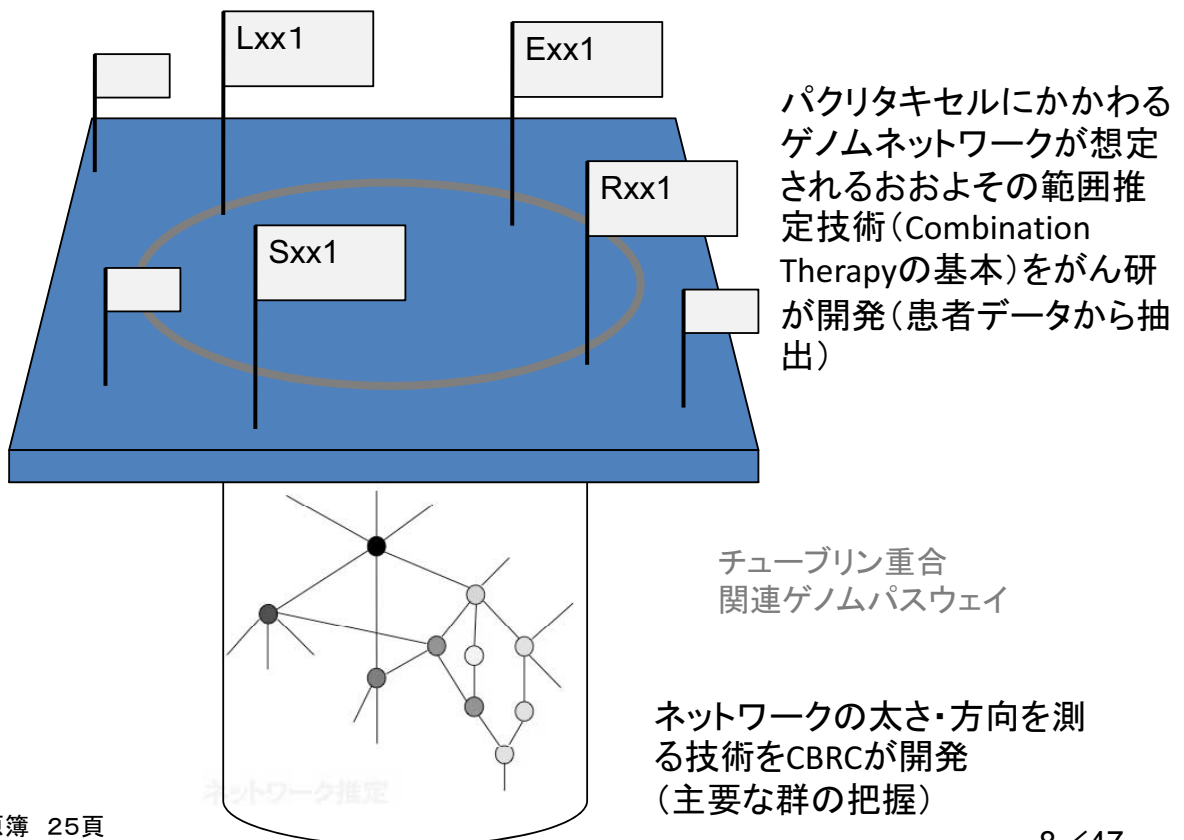
公開



事業原簿 25頁

解析方法(1)範囲の限定

公開



事業原簿 25頁

8/47

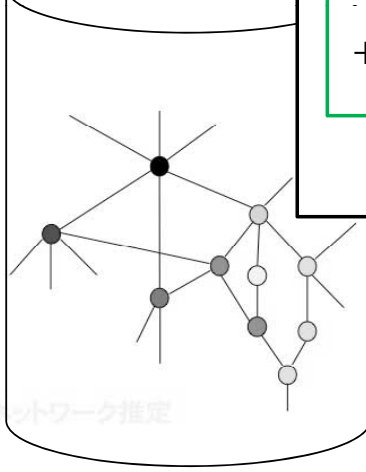
解析方法(2) ネットワークの構造と時系列特性の解析

従来法

- 誤差関数

$$E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right|$$

新規開発法(記号・数値最適化)

$$E' = \alpha \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right| + (1-\alpha) \sum_{t=1}^T (|C_1| + |C_2| + |C_3| + |C_4|)$$


ネットワークの太さ・方向を測る技術をCBRCが開発(主要な群の把握)

Pathway解析による創薬の基盤確立

問題点

解決方針(パラダイムシフト)

従来、分子を標的として探索
一方、生体分子は分子間相互作用により「機能」を発揮



標的分子探索から標的パスウェイ探索へ転換
(ハイスループット探索による創薬には限界)

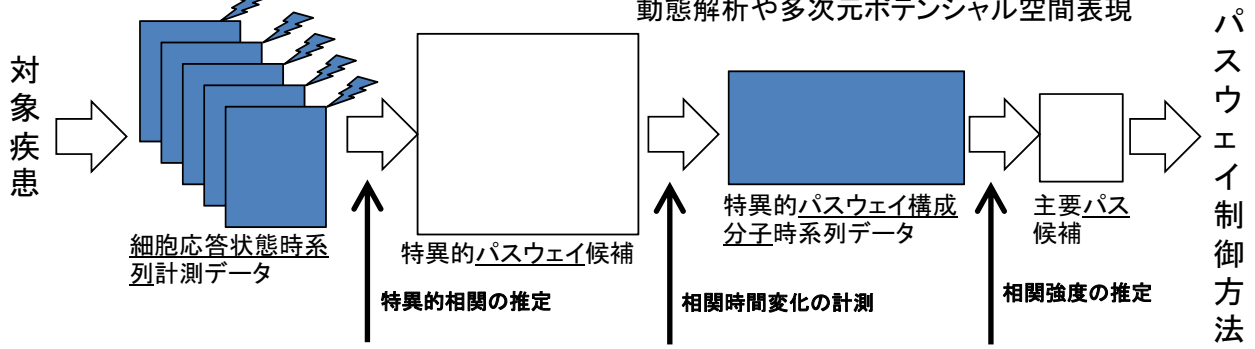
従来、一時点もしくは時間を無視して細胞状態を探索
一方、生細胞は時間変化に応じて「機能」を変化



単純な遺伝子探索から時系列パスウェイ解析へ転換
(分子から分子集合(パスウェイ)の動的状態把握へ転換)

解決法

多元動的状態解析→探索空間の絞り技術との連携により、高度動態解析や多次元ポテンシャル空間表現



“Network Screening”(CBRC・堀本)
ネットワーク補完(京大・阿久津)

生細胞時系列計測

高精度パラメータ推定

高速化、精密化、大規模性、絞り込み、に関する状況

公開

高速化と大規模性は可能であれば有用

現状は精密さと大規模性は必ずしも同行しない

絞り込み: 選択方法が科学的に確立していることが求められる

パスウェイ解析: 精密計測技術が必要

パスウェイに関するより深い科学的理解が必要

遺伝子発現の測定は細胞内状態についてどのような理解を提供するか

システムバイオロジーの発展と共に理解が深まると考えられる

数的な把握が必須。単純な相関ではなく、細胞内の分子の挙動が

形成する(あるいは従う)独自の数的関係の理解が必要

細胞を用いる条件:

細胞の特性が体内にあるときの状態を正しく維持するか

変化したとしても体内における状態へ換算できる様な理解があるか

それとも少なくともマウスの実験よりは信頼できるデータが得られるか

事業原簿 93頁

11/47

高速化、精密化、大規模性、絞り込み、に関する状況

公開

高速化と大規模性は可能であれば有用

現状は精密さと大規模性は必ずしも同行しない

絞り込み: 選択方法が科学的に確立していることが求められる

パスウェイ解析: 精密計測技術が必要

パスウェイに関するより深い科学的理解が必要

遺伝子発現の測定は細胞内状態についてどのような理解を提供するか

システムバイオロジーの発展と共に理解が深まると考えられる

数的な把握が必須。単純な相関ではなく、細胞内の分子の挙動が

形成する(あるいは従う)独自の数的関係の理解が必要

細胞を用いる条件:

細胞の特性が体内にあるときの状態を正しく維持するか

変化したとしても体内における状態へ換算できる様な理解があるか

それとも少なくともマウスの実験よりは信頼できるデータが得られるか

当プロジェクトは応用技術を目指すものであるが、上記の大きな技術発展の一部でもあり、創薬技術の将来方向をデータと技術開発をもって示す役割をになっていると考える

事業原簿 93頁

12/47

第2章

時系列解析技術開発

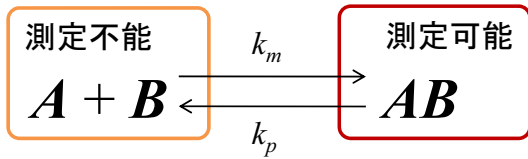
CBRC、東大、RICEつくば

刺激応答リン酸化cis-elementに関して、生きた細胞内で活性化ネットワークの同定を可能にする新技術を開発した。



3. 非計測分子を含むネットワーク動態解析技術

結合と解離

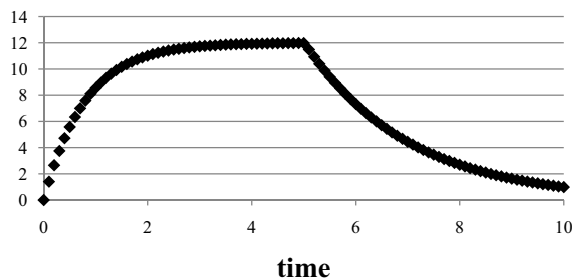


$$\begin{cases} \frac{d[B]}{dt} = k_m[AB] - k_p[A][B] \\ \frac{d[AB]}{dt} = k_p[A][B] - k_m[AB], \end{cases}$$

where $\begin{cases} [A] = a & \text{if } t \leq t_c \\ [A] = 0 & \text{otherwise} \end{cases}$

事業原簿 40頁

Reference Curve for [AB]



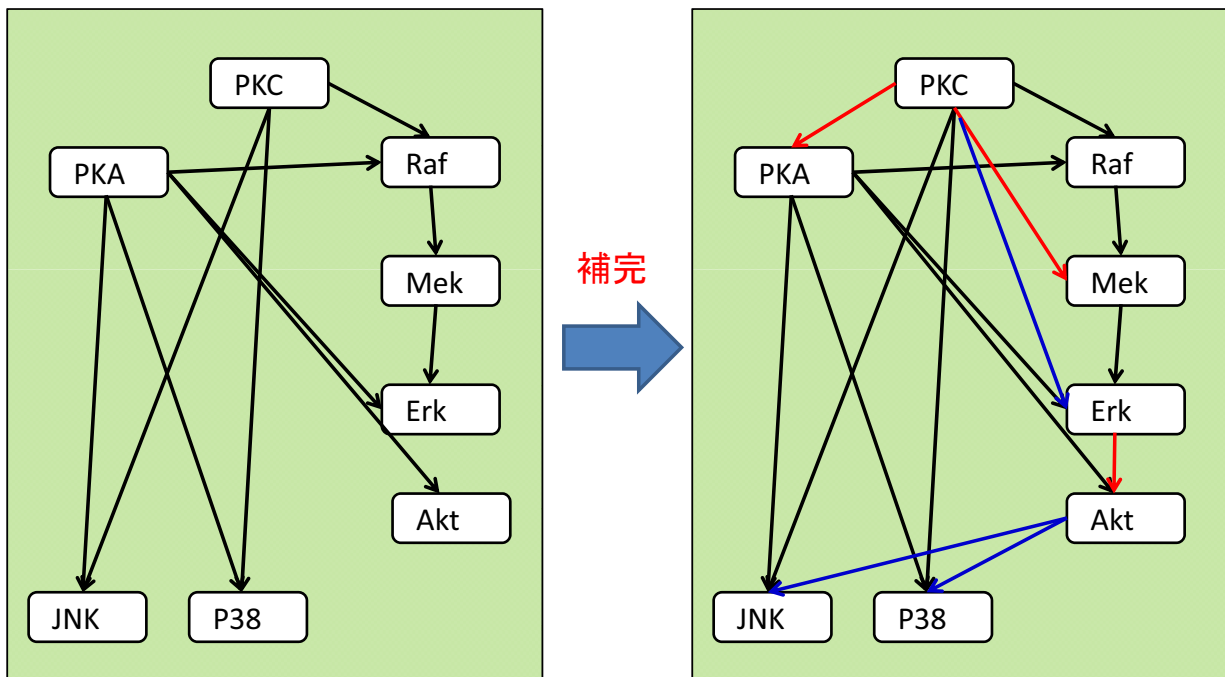
反応パラメータ
 $k_p = 0.05, k_m = 0.5, t_c = 5.0$

初期値
 $A(0)=15.0, B(0)=20.0,$
 $AB(0)=0.0$

実数値遺伝的アルゴリズム(UNDX + MGG)
 終了条件
 許容誤差 : 1.0%
 最大世代数 : 20,000
 試行回数 : 200
 $\alpha=0.1$
 最適化対象の反応パラメータ: k_p, k_m

5. ネットワーク補完技術

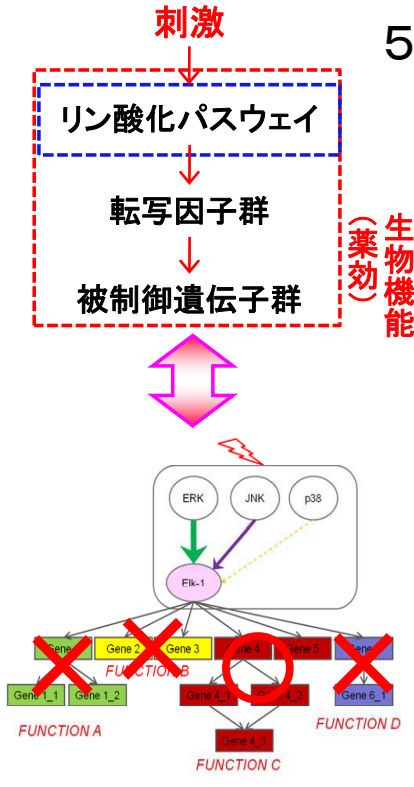
シグナル伝達ネットワークへの適用



→ 妥当そう

→ 妥当でなさそう ?

5. ネットワーク補完技術(つづき)



生細胞内の活性化ネットワークを同定・検証・拡張
 事業原簿 40頁

未解決問題の解決
 高精度
 Easy-handling

実用的かつ
 広範囲な適用

従来の標的絞り込み以上に比べ、革新的に高精度
 ▼生きた細胞で
 ▼転写因子の活性化に注目
 ▼複数分子の関連性(ネットワーク)
 ▼高精度解析のプロトコルが単純
 ▼レポーター遺伝子の導入
 ▼蛍光の撮影
 ▼解析ソフトウェアによる判定

- 刺激毎に異なる主要経路の同定
- 細胞種毎に異なる主要経路の同定
- 主要経路制御下の遺伝子群の同定

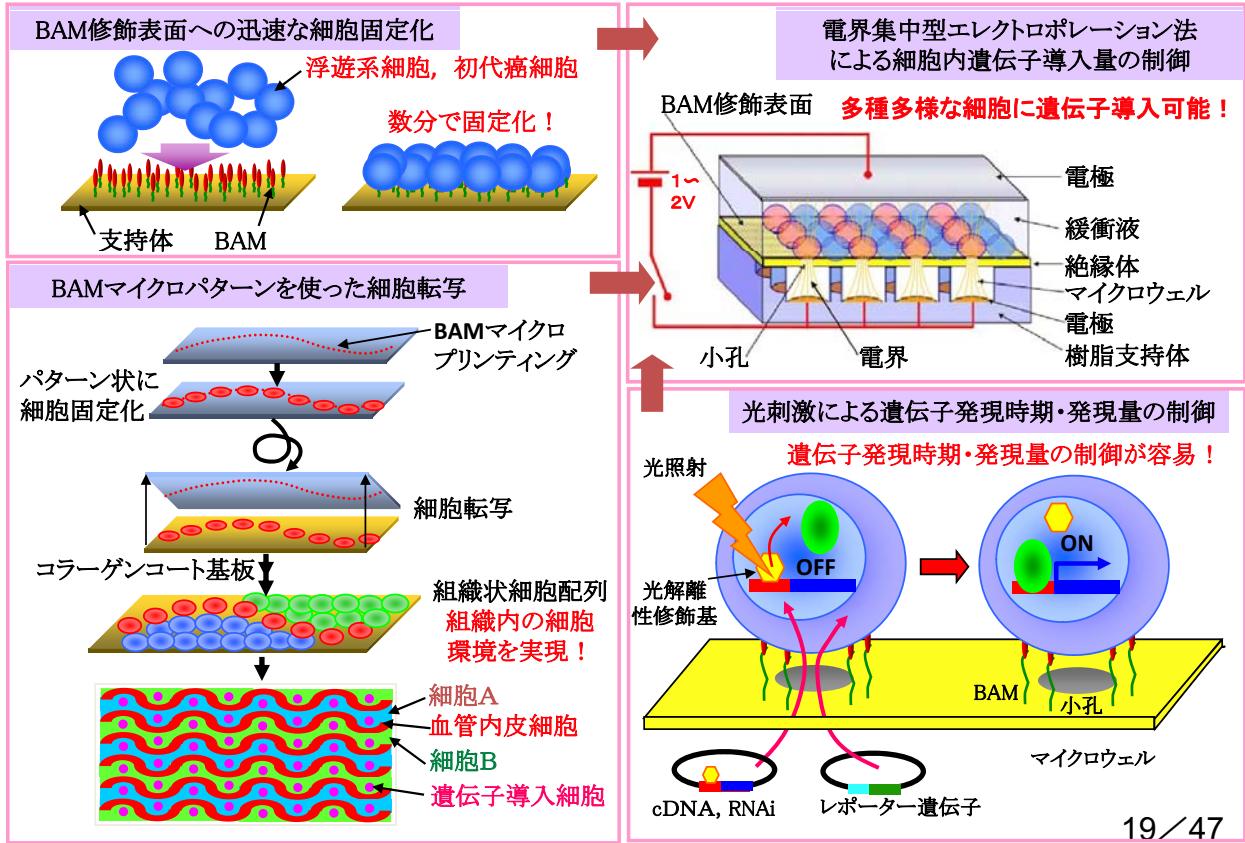
創薬スクリーニングのみならず、
 様々な創薬プロセスに有効
 17/47

第3章

デバイス関連技術開発

①浮遊系細胞用セルアレイ技術の研究開発

公開

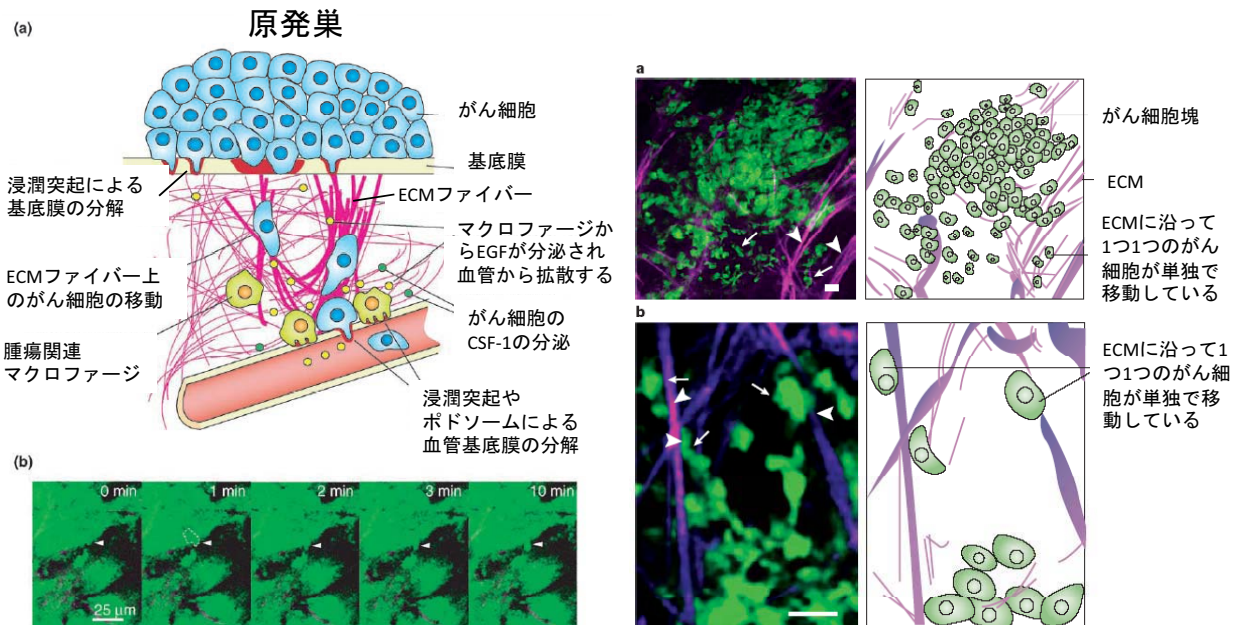


【東大・産総研RICE臨海グループ】

公開

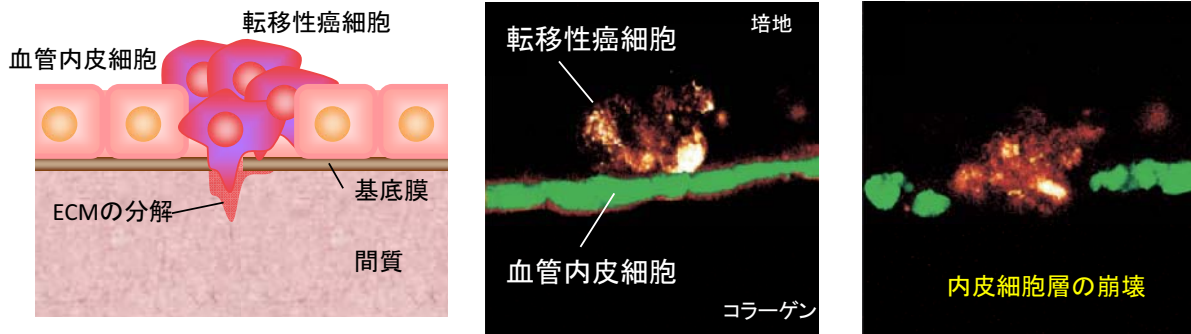
癌細胞運動性評価チップの開発

癌組織における細胞運動の可視化

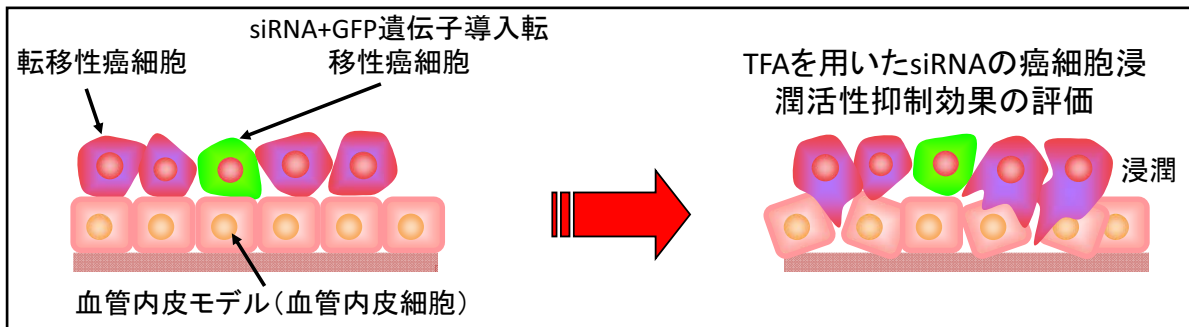


癌細胞浸潤能評価チップの開発

癌細胞の血管内皮細胞層への浸潤

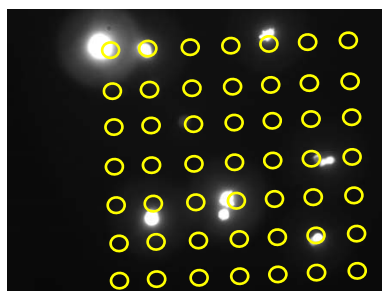
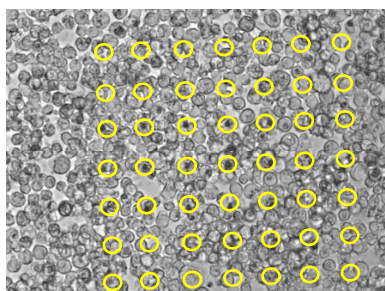
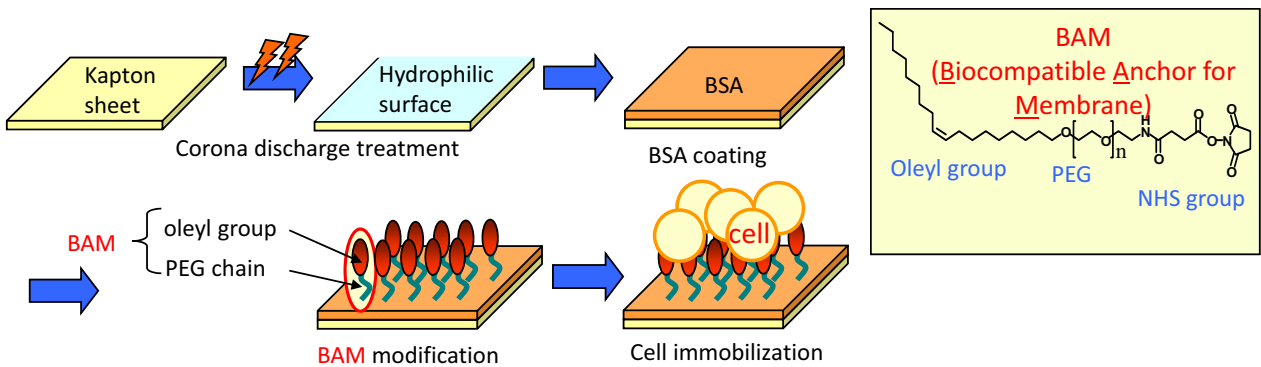


J Cancer Res Clin Oncol (2002) 128: 533-538



低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

浮遊系細胞へのプラスミドの導入



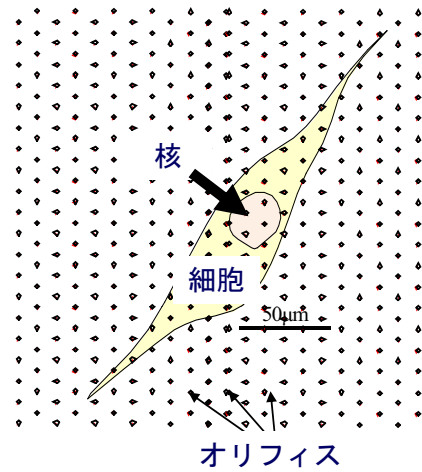
細胞 : K562
 プラスミド : 200ng/μl pVirus-C1
 パルス : 矩形波, 10V, 100msec, single

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

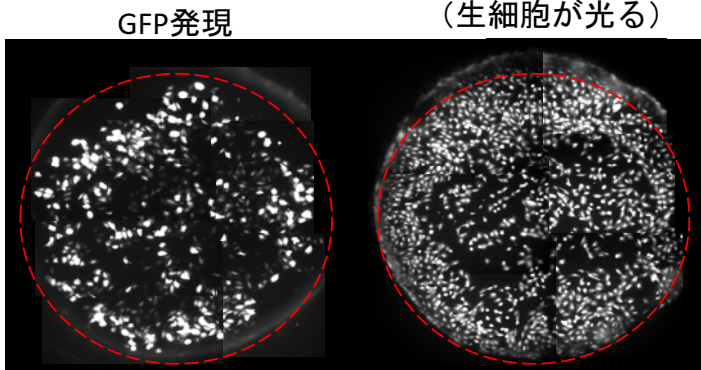
高密度オリフィスの開発

電気泳動により核にプラスミドを導入すれば高発現率

- ・核の直下に1つ以上のオリフィスがあり、かつ十分な電界集中が得られるよう、ピッチを最適化
- ・リソグラフィーによるオリフィスシート作製法の開発



実験結果



- ・数10%の導入率が安定して得られた
- ・パルス印加前とほぼ同じ生細胞数

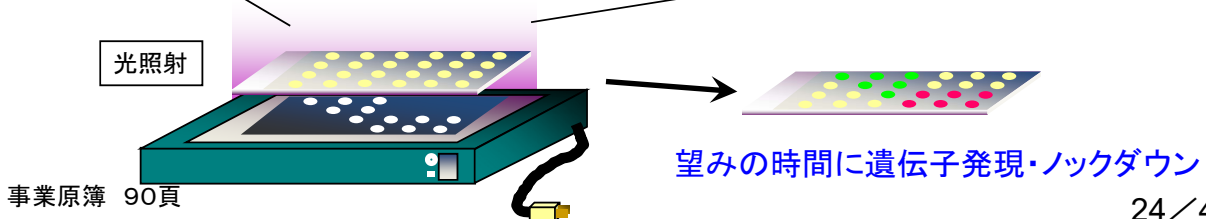
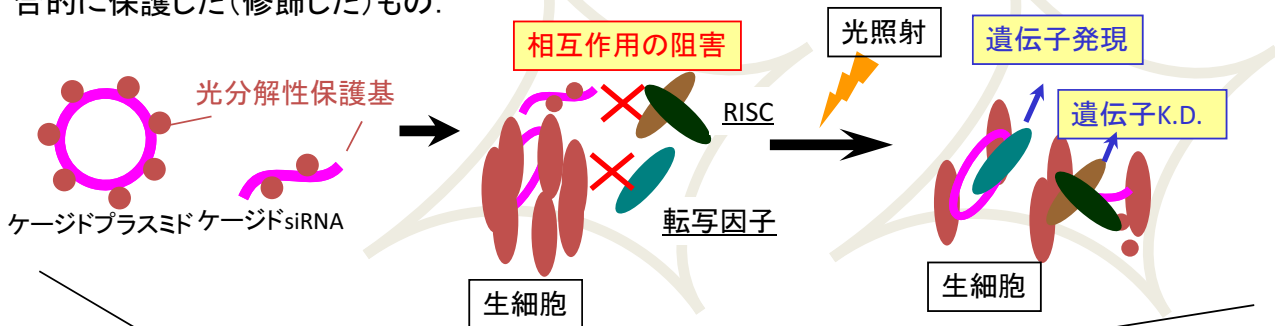
媒質：マンニトール溶液、濃度：150mM、
 導電率：1mS/cm (生理塩濃度~10mS/cm)
 細胞：MSC細胞、444個/mm
 パルス：4V、200msec矩形波、単発

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

ケージド核酸を用いた遺伝子発現制御

ケージド核酸

光分解性化合物で核酸を共有結合的に保護した(修飾した)もの。



第4章

応用研究 創薬へ向けての技術応用へのアプローチ

事業原簿 29、93頁

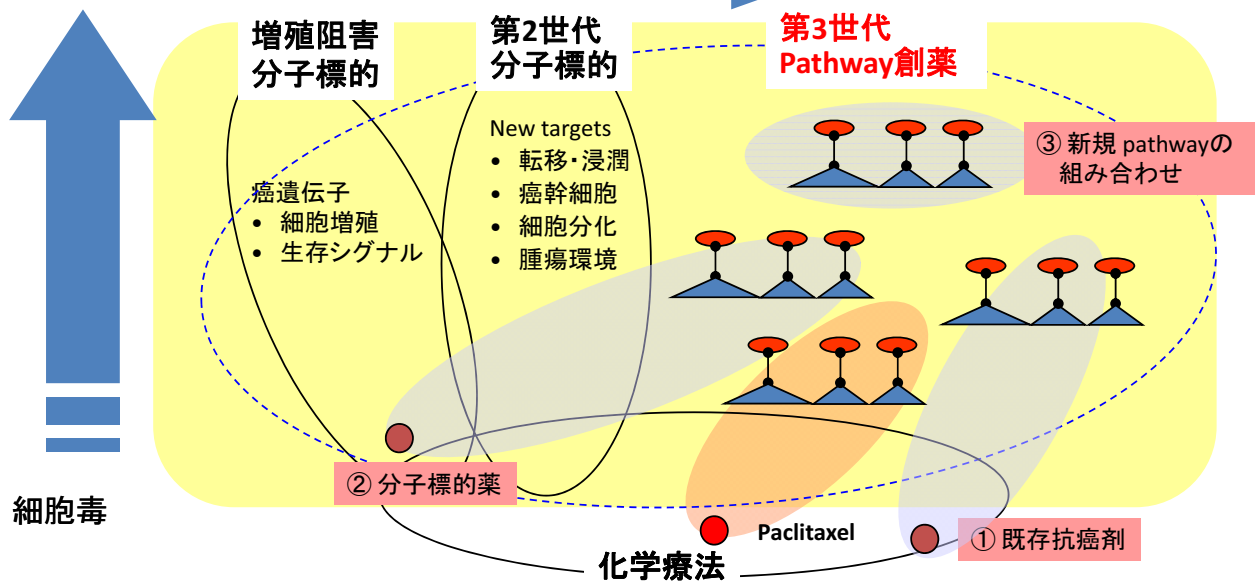
25/47

最終報告の要点 / 癌研・協和発酵キリン

抗癌剤創薬から見たプロジェクト成果の位置付け

分子標的創薬

Pathway創薬



Pathwayとして抽出される標的とその組み合わせによる新たな創薬展開

- ① 既存抗癌剤とその感受性関連pathwayの組み合わせ
- ② 分子標的薬とその感受性関連pathwayの組み合わせ
- ③ Pathway組み合わせ

26/47

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 (→ 耐性変異に有効な第2世代のキナーゼ阻害剤開発)
Iressa、Tarceva ; EGFR感受性変異(野生型の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 (→ K-ras変異診断で患者選択)

臨床試験から見つかった分子標的薬単剤の効果予測マーカー
(併用効果を予測するものではない)

➤ マイクロアレイ解析による予測

患者予後、薬剤感受性、非感受性の患者 or 細胞株

Oncotype DX、MammaPrint ; 乳癌再発と相関する遺伝子発現パターンによる診断
→ ホルモン療法後の化学療法(アジュバンド)実施の判断

薬剤投与前の患者プロファイルから、感受性を予測して患者を選択
(併用剤の選択を意図したものではない)

➤ 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
薬剤併用時の遺伝子間の機能的(動的)繋がりは意識していない

本プロジェクトの特徴とその意義

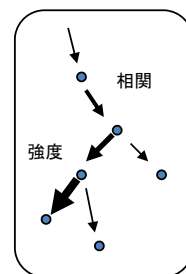
既存薬の効果を増強する併用分子標的創薬への試み

- 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。

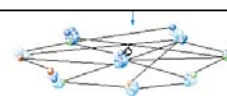
薬剤併用時の細胞内の動的なパスウェイに作用するものを見出す方法論の確立

時系列解析技術の必要性

- 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。



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。

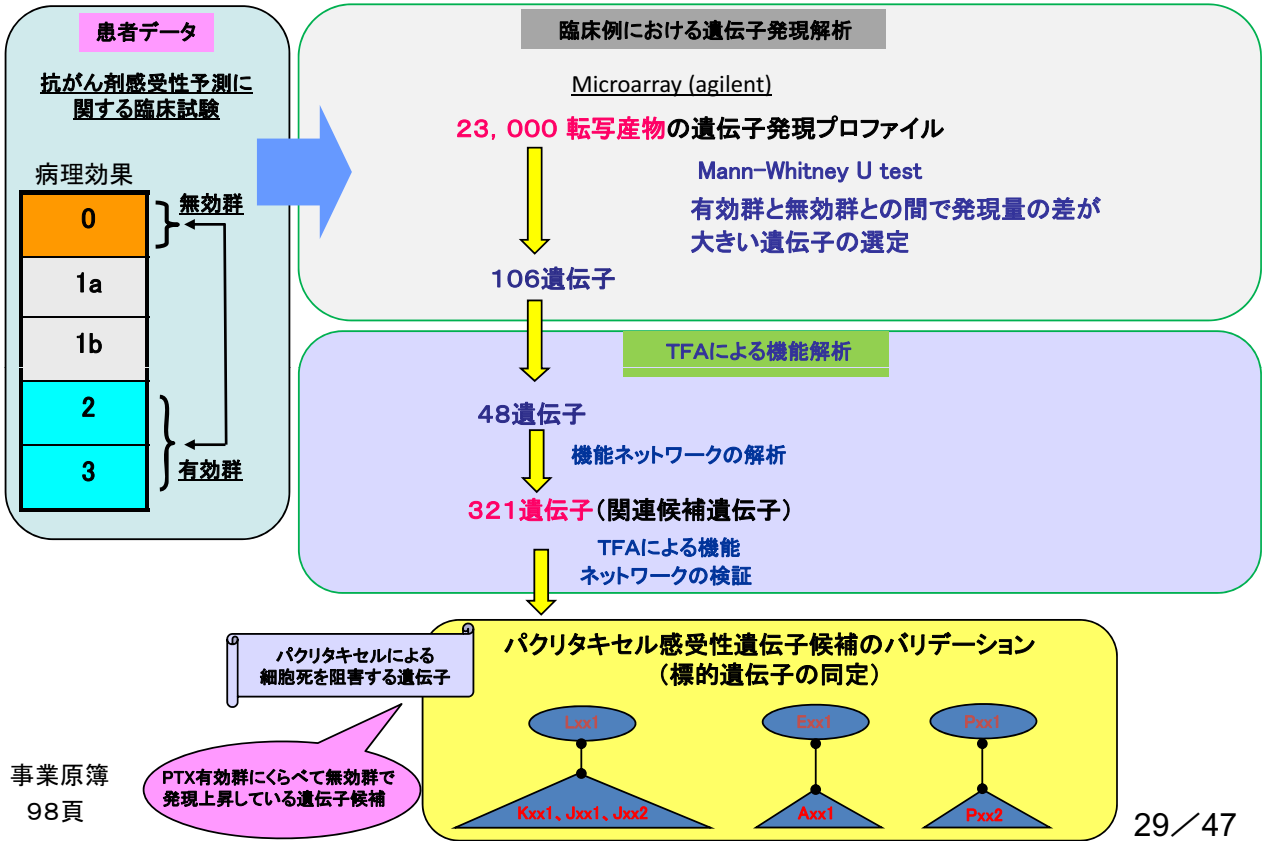


N次元要素(遺伝子、パスウェイ、時間)からなる状態

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

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候補遺伝子の同定: PTX感受性診断用途

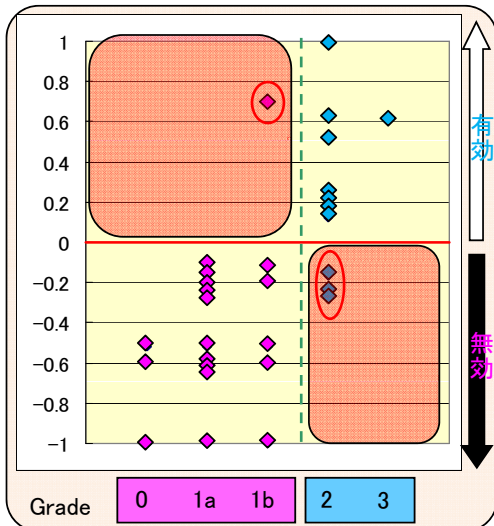
TFAで選定した遺伝子を用いたパクリタキセル治療効果予測診断システムの構築と検証

パクリタキセル治療効果予測診断システムの構築

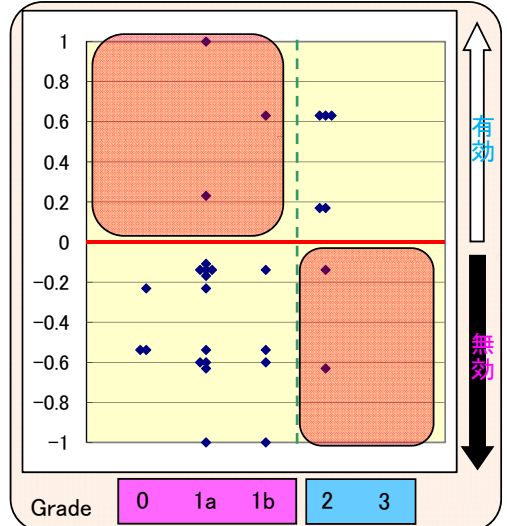
新規臨床試験症例を用いた診断システムの検証

TFAで選定された遺伝子を用いたAdaBoost解析による診断システムの構築 (4遺伝子)
臨床例40例
無効28例 (Grade 0-1b) 有効12例 (Grade 2, 3)

構築した診断システムによる新規症例の診断 -治療効果予測-
臨床例28例
無効21例 (Grade 0-1b) 有効7例 (Grade 2, 3)

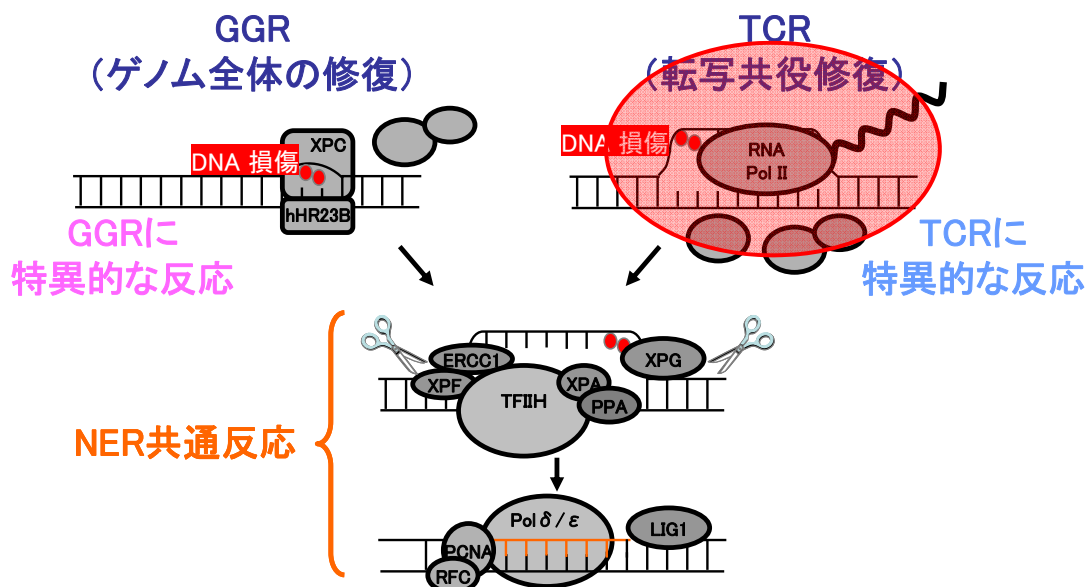


Leave-one-out cross validationの結果
誤判別率=10% (4/40)



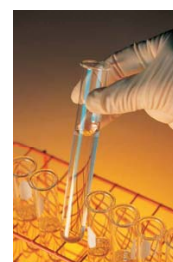
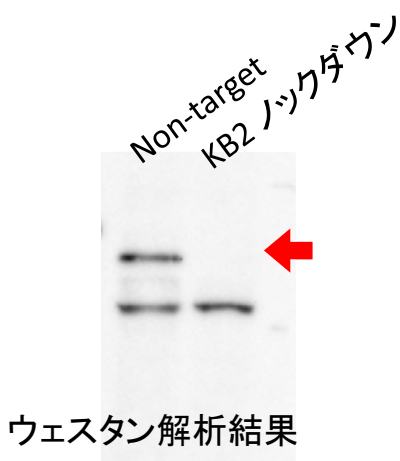
正診率=82%
誤判別率=18% (5/28) 30/47

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？

KB2 をターゲットとした素材探索評価系の構築



企業内で実施予定
化粧品素材探索評価
への応用

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

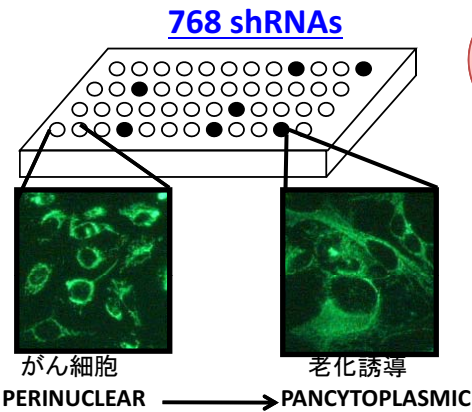
遺伝子ターゲット

公開

遺伝子サイレンシング

二重重複アッセイ

ガン細胞の遺伝子解析

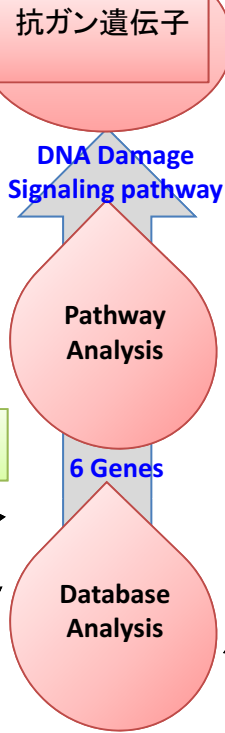


モータリン染色レポーター
"Induction of senescence in cancer cells"

23 shRNAs

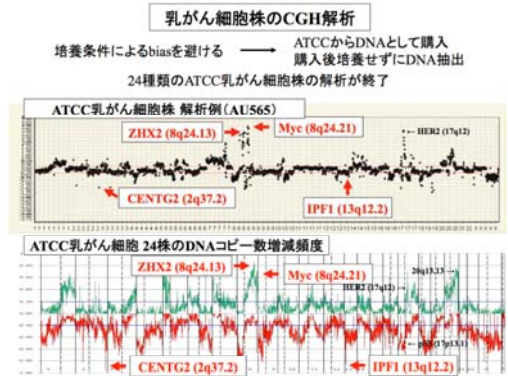
6 Kinds of cancer cells
INDUCTION of SENESCENCE

9 shRNAs



Comparative Genomic Hybridization analysis
CGH-BAC Array

24 breast cancer cell lines



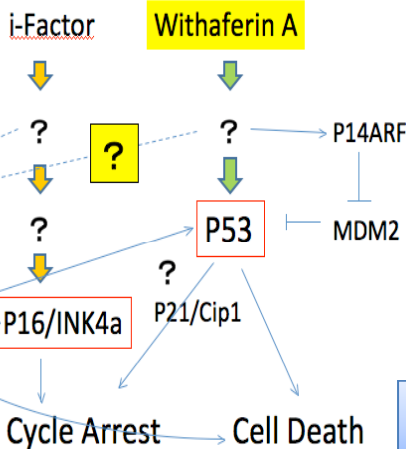
Gainが見られたBAC clone数
76 clones

33/47

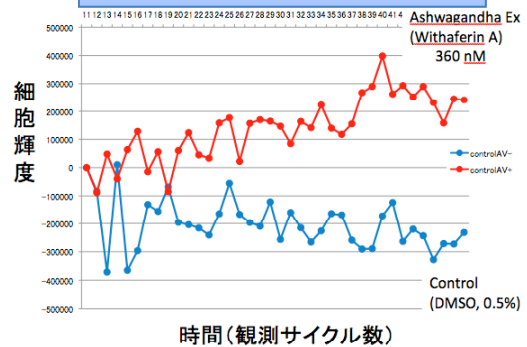
得られた遺伝子の解析 時系列解析

公開

i-Extract



AshwagandhaはAP1を活性化する



Withaferin AによるAP-1活性化の阻害剤による抑制 (JNK or P38)



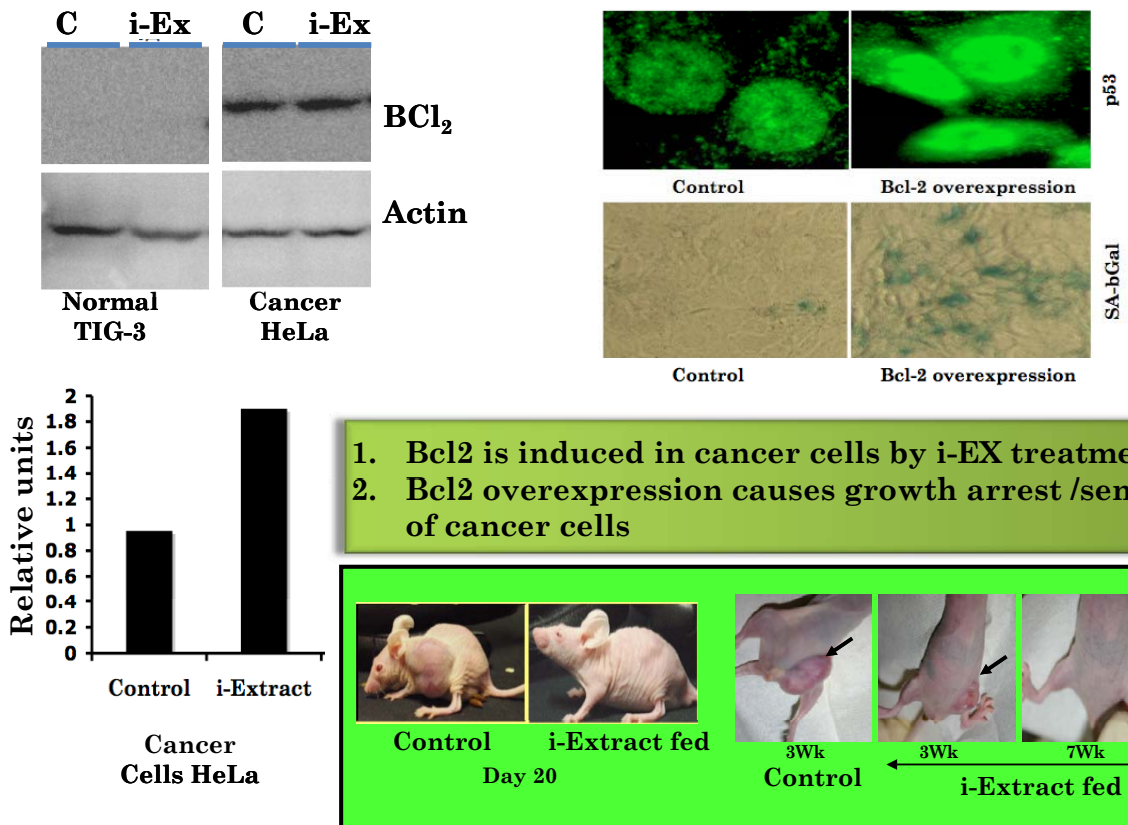
MAPK Chemical Inhibitors

ERK (ERK inhibitor III) JNK (SP600125)

p38 (SB203580) MEK 1/2 (U0126)

得られた遺伝子の解析

公開



山口大学

公開

手術によって摘出された乳がんのアレイCGH (comparative genomic hybridization)によって病態評価、治療法、創薬に繋がるゲノム情報を得る

アレイCGHによるDNA copy number aberrations (DCNAs)とホルモン受容体発現、HER2増幅の有無と対比することにより、これらと関係したDCNAの抽出が可能であった。

いわゆるtriple negative例では、一つのコピー数減少を呈する染色体領域が同定され、そこに存在する遺伝子発現はそれらの症例で低下していた。

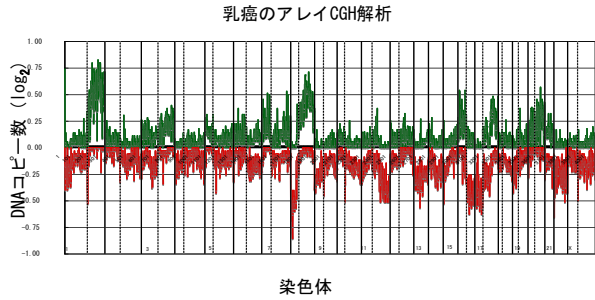
このことは、当該遺伝子物質が創薬候補となると同時にその適用となる症例を選別することが可能であることを示唆している。当該遺伝子物質は既に、医薬品として利用されており、適応拡大として乳がん治療薬として実用化は可能である。

in vitro実験では、当該物質の添加への反応性は、細胞のゲノム状態に左右される

<システムバイオロジー>

乳癌の最も一般的な組織型である浸潤性乳癌166例から35例を選んでアレイCGHによるDNAコピー数の異常について解析を行った。

特定に部位に異常は集積するが、培養細胞に比較して変化は少なく、乳癌の生物学的特徴(ER, PR発現、リンパ節転移等)と相関する変化も同定された。

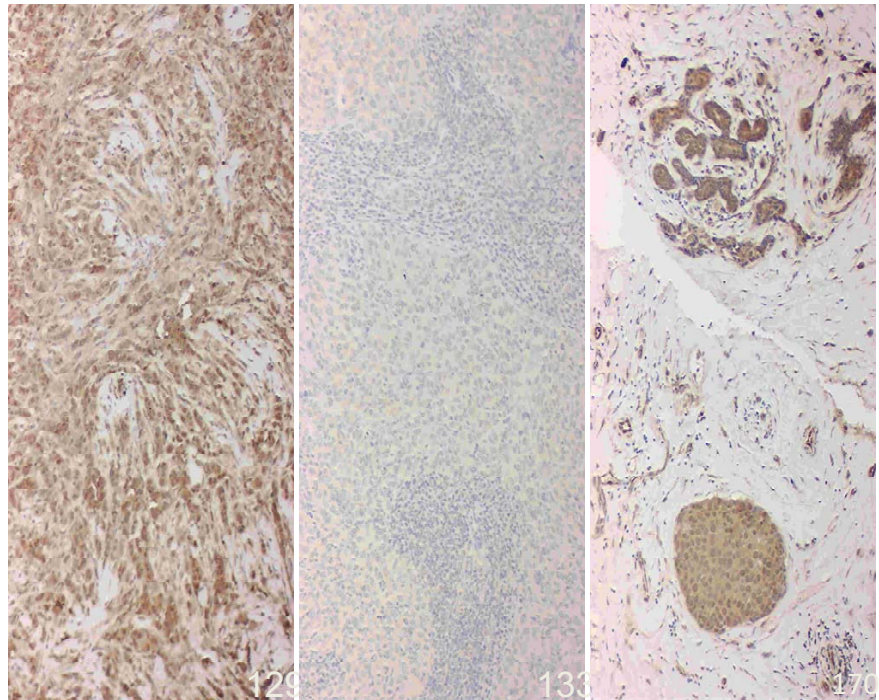


乳癌でDNAコピー数減少・増加を高頻度に呈する遺伝子

Gene	Locus	Frequency	Gene	Locus	Frequency
FAM90A6P, FAM9	8p23.	0.8571428	NFASC,	1q32.	0.8285714
DEFB106A, FAM9	8p23.	0.8	FCGR3A, FC	1q23:	0.8
FAM90A9, FAM9C	8p23.	0.7428571	DUSP10,	1q41	0.8
	8p23.	0.6857142	CNIH3,	1q42.	0.8
ERICH1, C8orf68,	8p23.	0.6571428	IL24, FAIM3	1q32.	0.7714285
DUXAP8,	22q11	0.6571428	SLC30A1, N	1q32:	0.7714285
DUXAP8,	22q11	0.6470588	.33(Cross-H	1p36:	0.7428571
ERICH1,	8p23.3	0.6285714	ASTN,	1q25:	0.7428571
CLDN23, MFHAS	8p23.1	0.6285714	KCNK2,	1q41	0.7428571
TK2, CKLF, CMT1	16q21	0.6285714	ASPM, ZBT	1q31:	0.7352857
ELAC2,	17p12	0.6285714	C1orf19,	1q25:	0.7142857
HS3ST3B1,	17p12	0.6285714	BTG2, FMO	1q32.	0.7142857
C8orf68,	8p23.3	0.6	MDM4, LRR	1q32.	0.7142857
GATA4, C8orf49,	8p23.1	0.6	CNTN2, TM	1q32.	0.7142857
INTS10,	8p21.3	0.6	OR2T4, OR	1q44	0.7142857
	8p21.3	0.6	SH3BP5L, Z	1q44	0.7142857
ASGR1, DLG4, ALCAM	17p13.1	0.6		8q23:	0.7142857
	16q21	0.5882352		1q43	0.7058823
C8orf42,	8p23.3	0.5714285		1q31:	0.6857142
C8orf68,	8p23.3	0.5714285	PLXNA2,	1q32:	0.6857142
AGPAT5,	8p23.1	0.5714285	OBSCN,	1q42.	0.6857142
MSRA,	8p23.1	0.5714285	RUNX1T1,	8q21:	0.6857142
DLC1,	8p22	0.5714285		8q22.	0.6857142
XPO7, NPM2, FGI	8p21.3	0.5714285			
DOCK5, GNRH1, I	8p21.2	0.5714285			
EXTL3,	8p21.1	0.5714285			
WWOX,	16q23.1	0.5714285			
ABR, MRPL14P1,	17p13.3	0.5714285			
GLP2R, RCV1, GPR120	17p13.1	0.5714285			
FBXW10, FAM18E	17p11.2	0.5714285			

Case No.	Histology	IFN γ Expression
79	PT	+
82	SC	+
83	ST	+
84	SC	+
85	SC	+
86	PT	+
87	PT	+
89	PT	++
92		
94	MUC	+
101	PT	+
105	SC	+
108	SC	+
109	SC	+
116	SC	+
118	Med	-
119	ST	+
122	SC	+
125	ST	+
128		
129	SC	+
130	SC	+
131	Med	±
133	Med	-
134	Med?	+
135	IL	+
147	SC	+
153	SC	+
155	ST	+
157	PT	+
158	Med	±
160	SC	+
163	SC	+
165		-
166	SC	+
168	PT	+
170	ST	+
171	SC	+
172	Med	+
173	ST	+
174	SC	+
175	ST	+
176	PT	+

Immunohistochemical examination of 12q15



PT: papillotubular carcinoma
 ST: solid-tubular carcinoma
 SC: scirrhous carcinoma
 Med: medullary carcinoma
 Muc: mucinous carcinoma
 IL: invasive lobular carcinoma

JBA集中研:セルアレイ作成実績

癌研究会分のみ抜粋

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

実施時期	供試した遺伝子	96穴プレートの枚数	プリント数(スポット数)
H17年度	20遺伝子(40 siRNA)	16枚	1356
	20遺伝子(40 siRNA)	32枚	3072
	93遺伝子(186 siRNA)	48枚	4608
H18年度	93遺伝子(186 siRNA)	72枚	6912
	93遺伝子(186 siRNA)	24枚	2304
H20年度	96遺伝子(192 siRNA)	72枚	6912
H21年度	10遺伝子	40枚	3840
	9遺伝子	48枚	4608
計			33612

セルアレイの作成

実施時期	供試した遺伝子	スライドあたりのスポット数(作成スライド枚数)	プリント数(スポット数)
H17年度	20遺伝子(40 siRNA)	288(6枚)	1728
H18年度	93遺伝子(186 siRNA)	288(2種類・6セット=12枚)	3456
	643遺伝子	432(8種類・8セット=64枚)	27648
H19年度	93遺伝子(186 siRNA)	288(2種類・6セット=12枚)	3456
H20年度	96遺伝子	288(2種類・6セット=12枚)	3456
H21年度	246遺伝子	480(2種類・6セット=12枚)	5760
計			45504

事業原簿
139頁

39/47

論文、学会発表、特許、顕彰等
件数一覧
注：各団体間に重複あり。

業績

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

事業原簿 141頁

40/47

成果

最終目標は十分クリア

成果の表現として個別技術の羅列ではなく以下の項目について客観的に提示できるだけのデータをもって方向を示すことができた

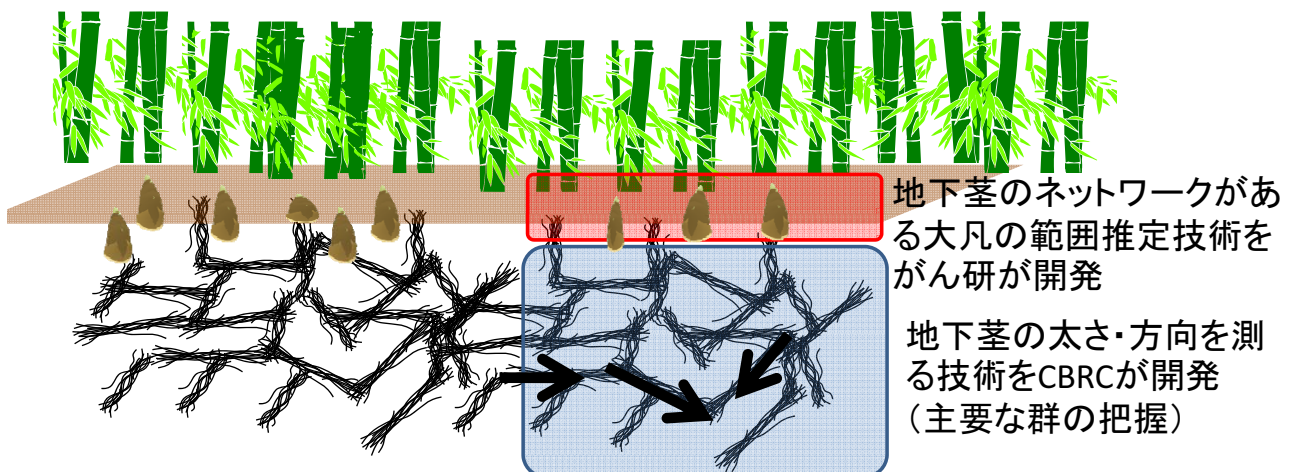
1. 細胞-ゲノムパスウェイ創薬技術の基礎の確立
2. パスウェイ予測技術を初めて開発
3. パスウェイ解析の応用:パクリタキセルを出発点とする
併用薬開発の方法を整えた
4. がんの転移計測に道を開いた
5. 機能性化粧品の開発にも応用が開始
(皮膚がん予防効果:企業での実用化研究開始)

最終目標

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用い、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。

41/47

タケノコから覗くパスウェイ解析



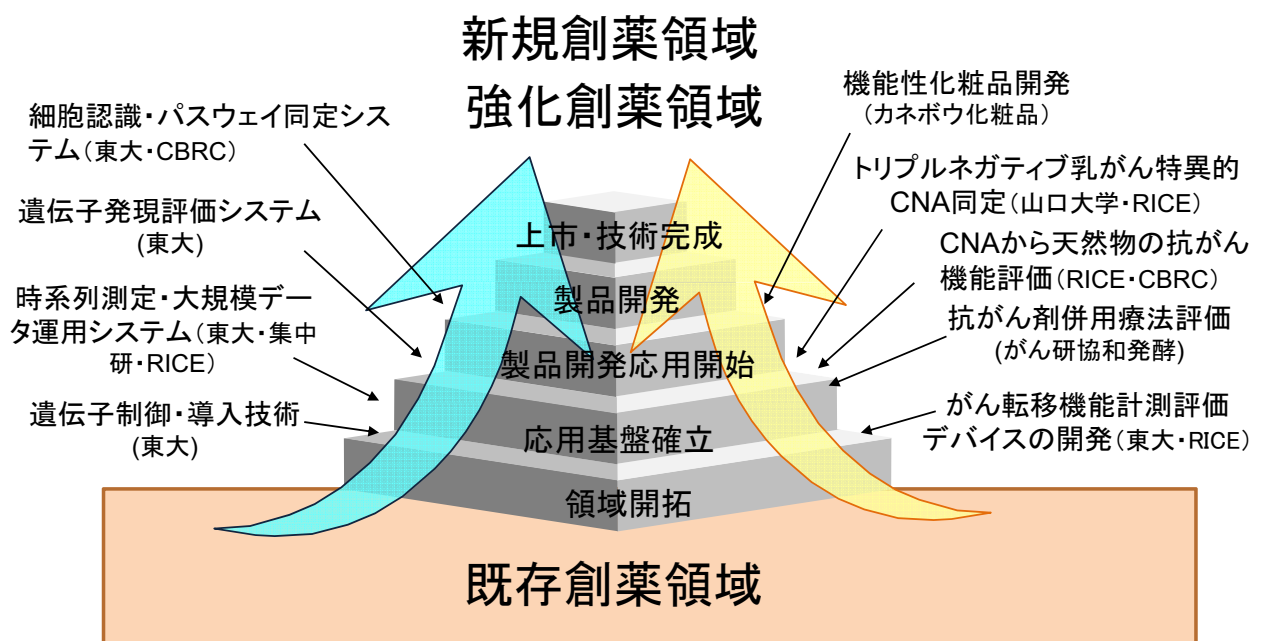
竹林の中のタケノコ(遺伝子)は地面の下で複雑な地下茎(パスウェイ)を持って相互に補完している

地上に出ている竹、タケノコ(遺伝子)をつぶしても竹林は影響を受けない。竹林を潰すためには地下茎を効果的に切断することが重要(養分の流れ、再生機能の強さを勘案)

42/47

IV. 実用化、事業化の見通しについて

達成状況と実用化への見通し



達成状況と実用化への見通し

時系列解析技術

•目標

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。

•達成状況

- ✓時系列局所細胞モニタリング装置の運用
- ✓大規模情報処理技術の運用
- ✓超微蛍光レポータ遺伝子画像解析システム開発
- ✓主要パス高精度同定システム
- ✓ネットワーク補完ソフトウェア技術の開発
- ✓遺伝子発現開始に関する評価技術の開発
- ✓染色体コピー数解析の過程で見出した遺伝子のtriple-negative乳がんへの応用

主要パス高精度同定システムについては市販ソフトへの組み込みを計画、他のシステムに関してもソフトウェアへの組み込みが可能である。

45/47

達成状況と実用化への見通し

デバイス関連技術開発

•目標

腫瘍の寛解とがんの改善は必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。この種の機構のかいせきに有用な新規デバイスの開発が必要となる。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、新奇な手法を用いた細胞の操作技術を開発する。

•達成状況

- ✓がん浸潤転移計測デバイスの開発
- ✓細胞運動性デバイスの開発
- ✓電界集中型オンチップエレクトロポレーション技術の開発
- ✓光ケージド化合物による遺伝子の時間的制御技術の開発

2種類のデバイスともに実用化を目指して企業の提携および探索を行っている。エレクトロポレーション技術については実用化段階にあり、ニーズの掘り起こしが課題となる。

46/47

達成状況と実用化への見通し

応用研究

•目標

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出せなかった新奇有効な抗がん剤の探索方法の確立につながると期待される。既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つながる機能性化粧品の開発に応用する方法を目指す。

•達成状況

- ✓次世代の抗がん剤治療予測システムの確立
- ✓他剤併用療法に関するがん治療、抗がん剤創成の新アプローチの開発
- ✓化粧品素材の開発
 - ✓紫外線感受性候補遺伝子の発見による機能性化粧品の創出
- ✓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

今回のケースを基盤にモデルケースを重ねることで併用治療の新しいアプローチを提供が可能となる。

発見された遺伝子を応用した機能性化粧品開発の検討段階にある。

47 / 47

「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7-1

Ⅲ. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

2. 研究開発項目毎の成果

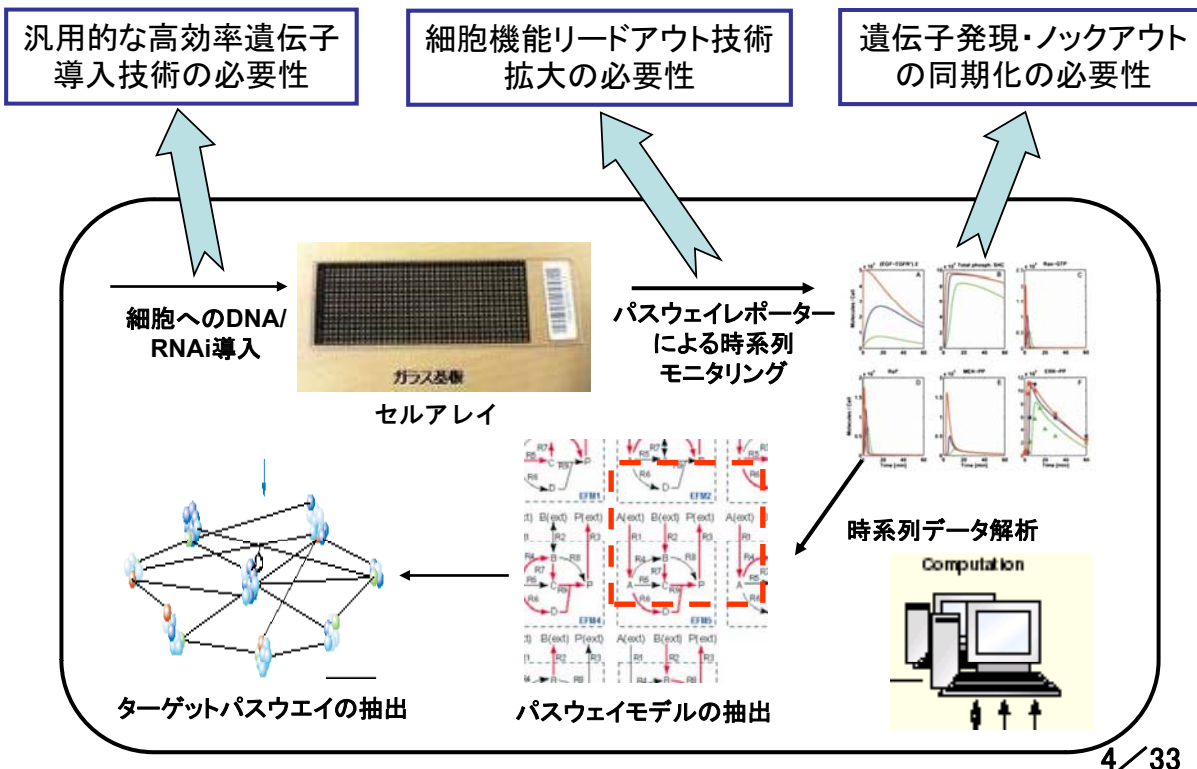
研究開発項目毎の成果

- ・ デバイス関連技術開発
- ・ 時系列解析技術開発
- ・ 応用研究

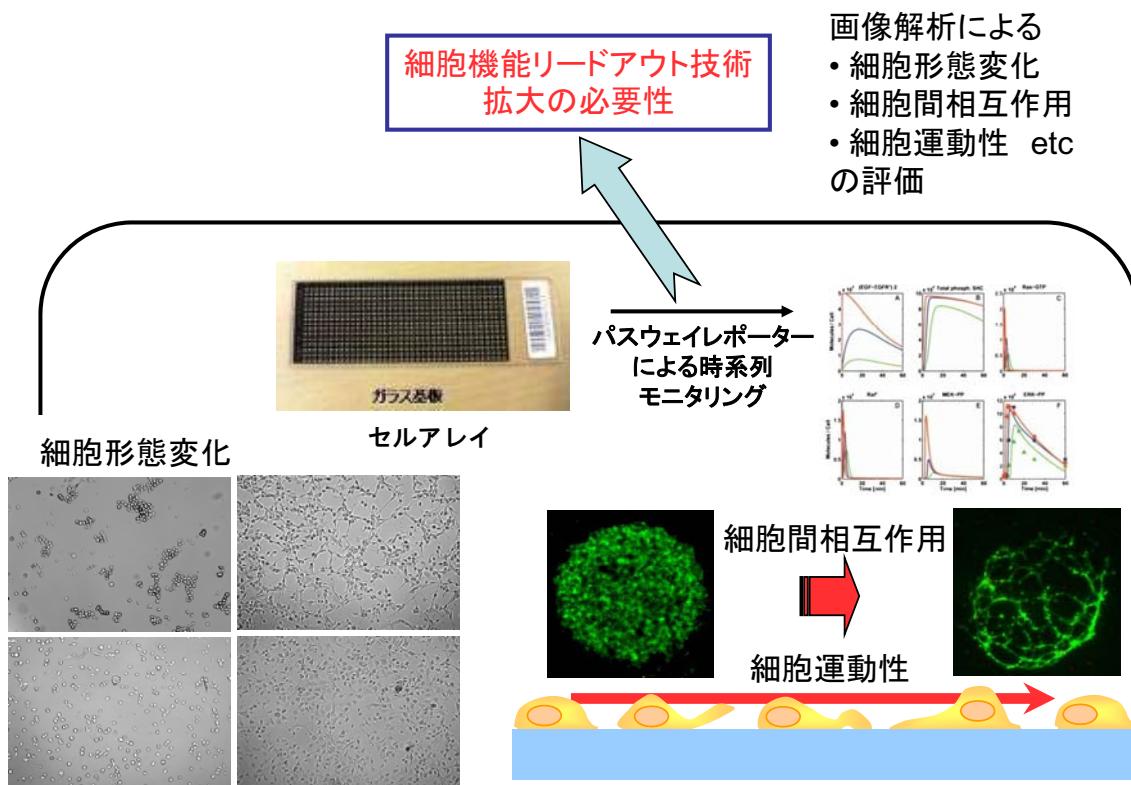
デバイス関連技術開発

- ・ がん浸潤・転移能検出デバイスの開発
 - ✓ がん浸潤能検出デバイス(東大・長棟研)
 - ✓ がん運動性機能検出デバイス(産総研・RICE臨海)
- ・ 低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発(東大・鷺津研)
- ・ 遺伝子発現の同期化技術の開発(東大・長棟研)

技術開発の背景



技術開発の背景



技術開発の背景

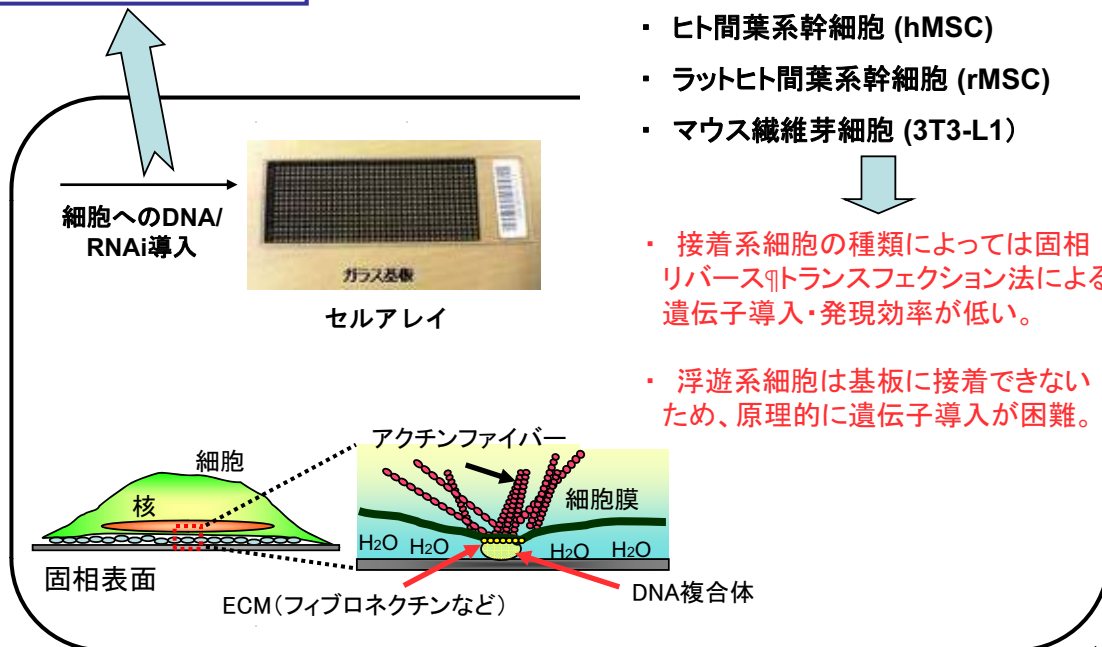
汎用的な高効率遺伝子導入技術の必要性

以下の細胞では遺伝子導入・発現効率が20~40%程度

- ・ ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)
- ・ ラットヒト間葉系幹細胞 (rMSC)
- ・ マウス繊維芽細胞 (3T3-L1)

・ 接着系細胞の種類によっては固相リバーストランスフェクション法による遺伝子導入・発現効率が低い。

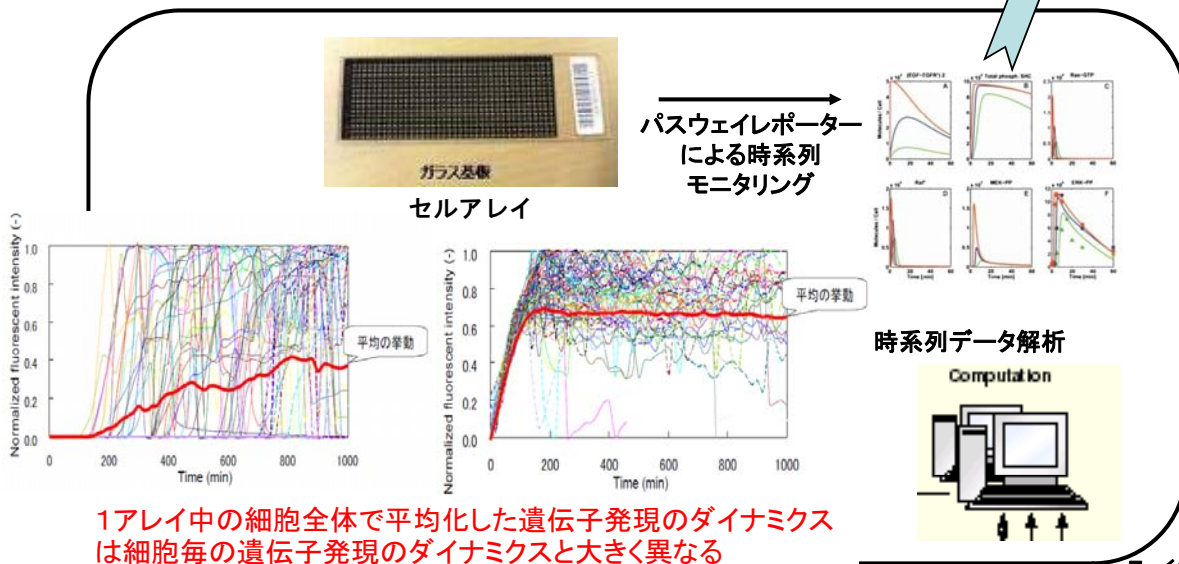
・ 浮遊系細胞は基板に接着できないため、原理的に遺伝子導入が困難。



技術開発の背景

遺伝子発現・ノックアウトを同期化することにより、細胞毎のダイナミクスを損なうことなく、統一的に細胞を扱うことができる。

遺伝子発現・ノックアウトの同期化の必要性



1アレイ中の細胞全体で平均化した遺伝子発現のダイナミクスは細胞毎の遺伝子発現のダイナミクスと大きく異なる

デバイス関連技術の開発

目標

パスウェイ創薬のターゲットの拡張と解析精度の向上を支援する技術の開発

- ・ セルアレイ技術を用いた癌浸潤・転移能関連遺伝子ハイスループット検出デバイスの構築と低侵襲高効率な汎用的遺伝子導入デバイスの開発
⇒ **セルアレイ技術の汎用性・有用性の向上**
- ・ 遺伝子発現パスウェイ時系列解析のための遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発
⇒ **光を用いた遺伝子発現・抑制の時空間的制御**

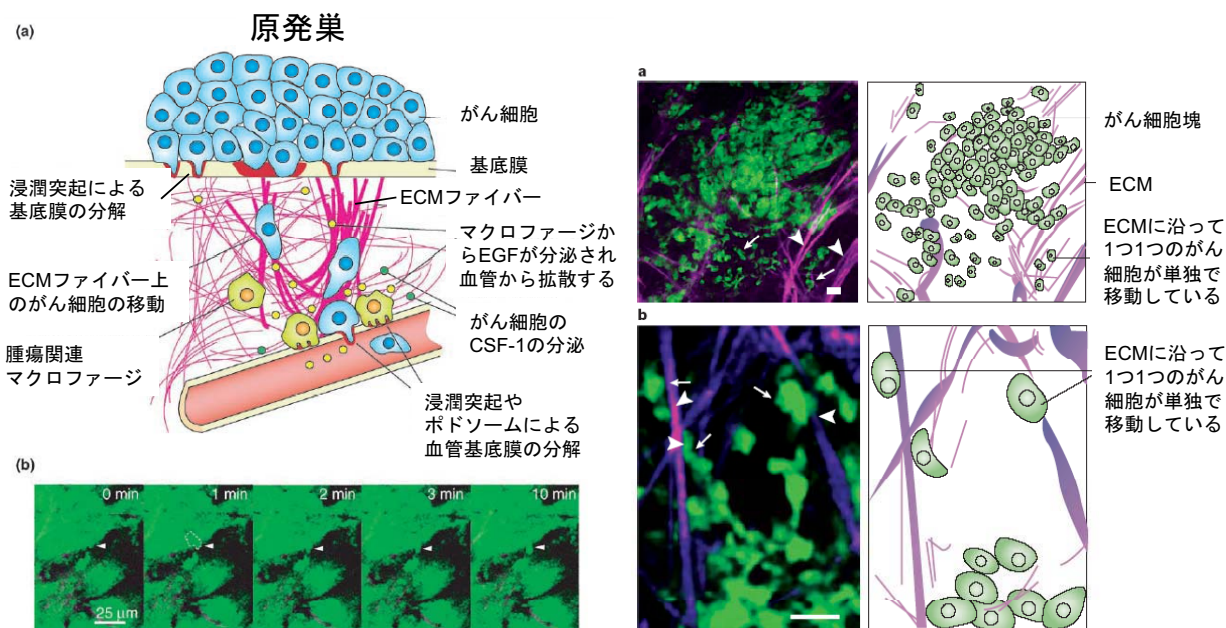
実施内容

- ① 癌浸潤・転移能評価系へのセルアレイ技術の応用と浮遊系細胞、弱接着系細胞、接着系細胞など、各種細胞に適用可能な低侵襲高効率な汎用的セルアレイ技術の確立
⇒ **癌細胞浸潤・転移能評価デバイスの構築(長棟研・三宅研、産総研RICE臨海)**
⇒ **低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発(鷲津研、長棟研)**
- ② 細胞に導入された遺伝子やsiRNAの発現時期の同期化ならびに遺伝子発現量・抑制量の制御が可能な分子システムの確立
⇒ **遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発(長棟研)**

8/33

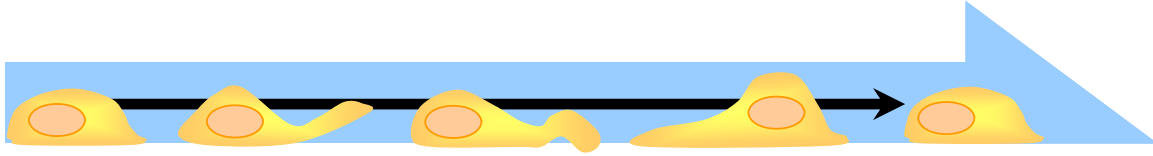
癌細胞運動性評価チップの開発

癌組織における細胞運動の可視化



癌細胞運動性評価チップの開発

細胞の方向性を持った遊走(細胞運動性)



現行の細胞運動性の評価方法

		長所	短所
Wound-healing assay		<ul style="list-style-type: none"> ・簡便。 ・マルチウェルを使ったスクリーニング系が確立されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・スクラッチする面積のコントロールが困難 ・Contact inhibitionの解除・細胞増殖に関する遺伝子群の影響を排除できない
Boyden chamber (Chemotaxis assay)		<ul style="list-style-type: none"> ・培地中に加えた誘引物質の評価が可能。 ・ゲルの重層によりプロテアーゼ分泌のステップも評価できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・再現性が取りにくい ・誘引物質に対するレセプターなど細胞運動にいたるまでの上流因子が多く取れてしまう。

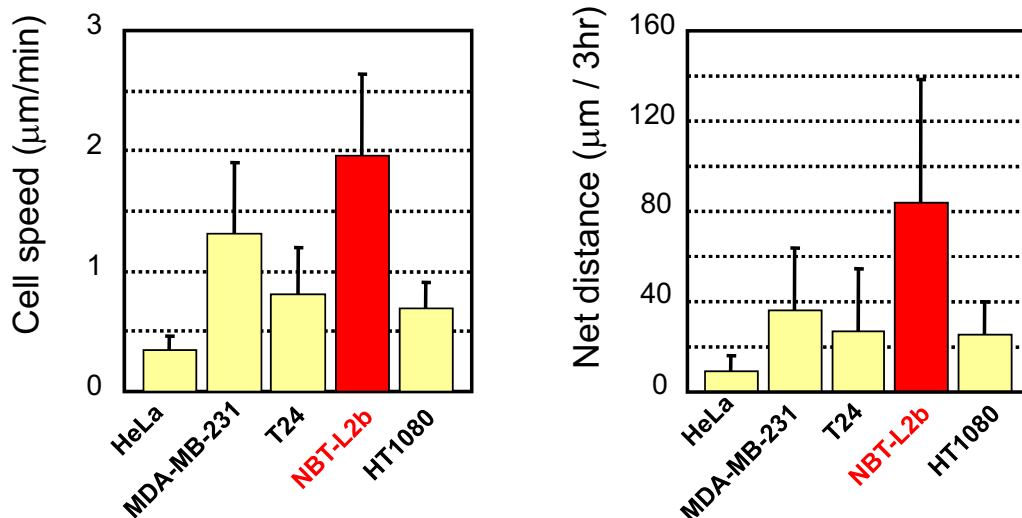
事業原簿
76頁

☆細胞遊走と形態形成の関係およびその制御には不明な点が多く、新規のスクリーニング手法の開発が必須

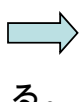
10/33

癌細胞運動性評価チップの開発

細胞運動評価用細胞の選定



コラーゲンコートディッシュでNBT-L2b(ラット膀胱癌細胞)が最も速い運動性と高い直線運動性を示した。

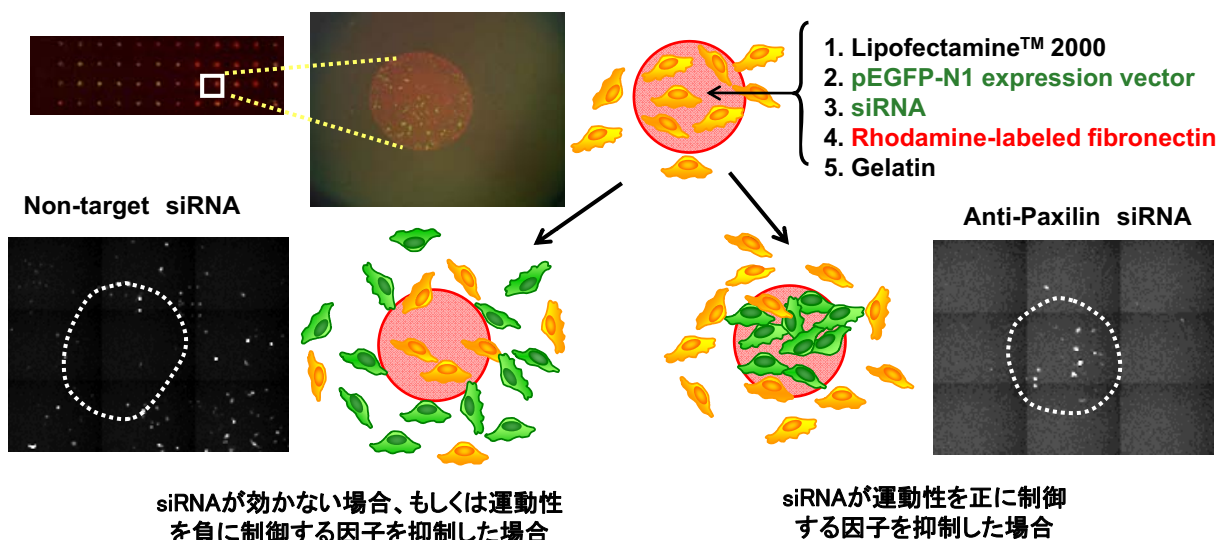


運動を阻害する薬剤やsiRNAのスクリーニング、細胞運動能を促進する遺伝子のスクリーニングに適している。

11/33

癌細胞運動性評価チップの開発

細胞運動性評価チップの開発



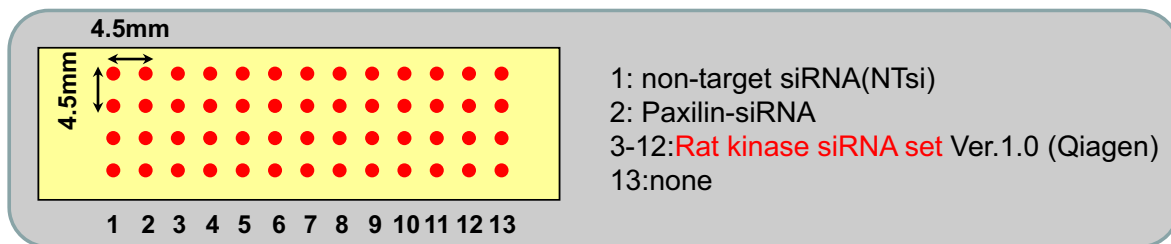
赤色蛍光内の緑色蛍光強度(EGFP発現ベクターとsiRNAが共導入された細胞)で簡便に運動性が評価できる

事業原簿 76頁

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

癌細胞運動性評価チップの開発

細胞運動を阻害する候補遺伝子のハイスループットスクリーニング

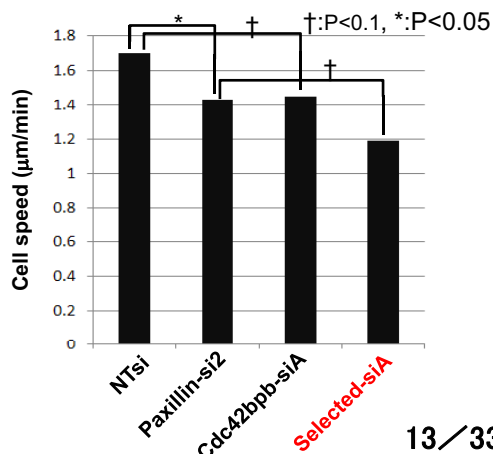


キナーゼ736遺伝子を阻害する1476 siRNAを用いたセルチップ解析

時系列細胞イメージを取得

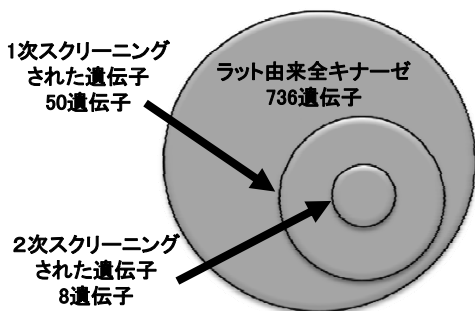
細胞の認識と細胞運動の追跡

細胞運動を阻害したsiRNAについて2次評価



癌細胞運動性評価チップの開発

スクリーニング手順と結果



手法：

★1st screening (736遺伝子→50遺伝子)

- ・細胞運動評価チップ
- ・4倍レンズにより撮像した画像の時系列解析 (細胞運動速度)

★2nd screening (50遺伝子→8遺伝子)

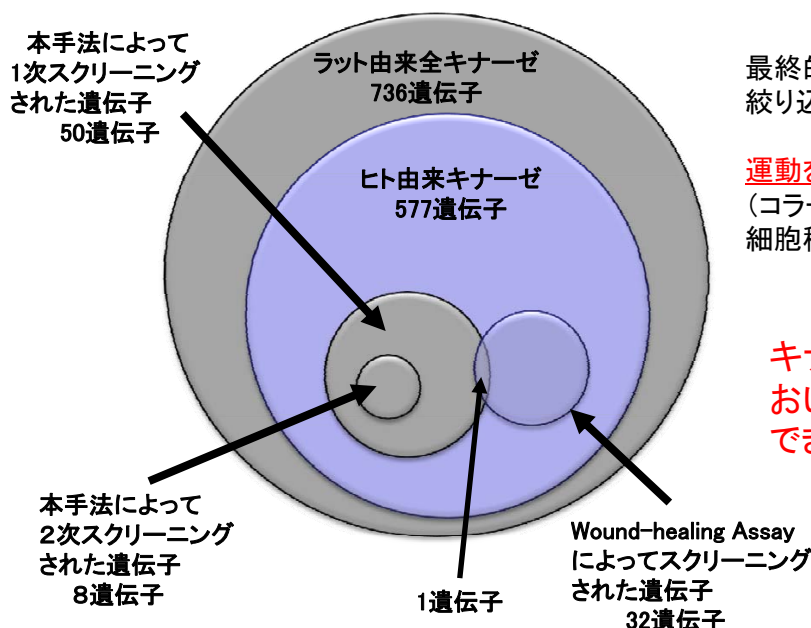
- ・24well
- ・20倍レンズにより撮像した画像の時系列解析 (細胞運動速度)
- ・siRNAによるノックダウン効果

Symbol	KD効率 %	細胞運動	疾患との関連	備考
gene12	50-60	既知??	糖尿病・肥満、膵管腺癌で発現↑	発現抑制により運動↓。調節機構未知 (Wound-healing assay)
gene43	50-60	未知		ERK1/2の活性調節に関与。
Tgfbr1	20-30	既知		EMTに関与。
gene39	60-70	未知		細胞死を誘導。
gene36	70-80	既知	浸潤性の乳がんの20~40%において体細胞変異が見られる。	
gene42	30-40	未知	結腸直腸癌で発現が高い。	細胞増殖を制御。オートファジーやERストレスにも関与。
gene16	50-60	未知	転移性のメラノーマで発現が高い。	
gene22	50-60	既知	肺がん・肝細胞がんが発現↑	細胞骨格調節因子

14 / 33

癌細胞運動性評価チップの開発

本手法と既存手法 (Wound-healing Assay) でのスクリーニングの比較



最終的に絞り込まれた遺伝子は、既報で絞り込まれた遺伝子と重複しなかった。



運動を誘導する手法の違い。
(コラーゲンコート vs 細胞の物理的剥離)
細胞種 (膀胱がん vs 乳がん) の違い。



キナーゼ以外のライブラリーにおいても未知の遺伝子を同定できる可能性が非常に高い。

15 / 33

癌細胞運動性評価チップの開発

まとめ

- ・ 細胞運動評価セルアレイ技術基盤を確立した。
- ・ Kinaseをターゲットとして細胞運動を亢進・抑制する因子の探索を行い、候補を抽出した。

実用化への方向性

- ・ 一細胞ごとの細胞評価により、遺伝子発現、薬剤応答、細胞運動を詳細に解析する技術を確立し、創薬・医薬品開発支援技術として役立てる。

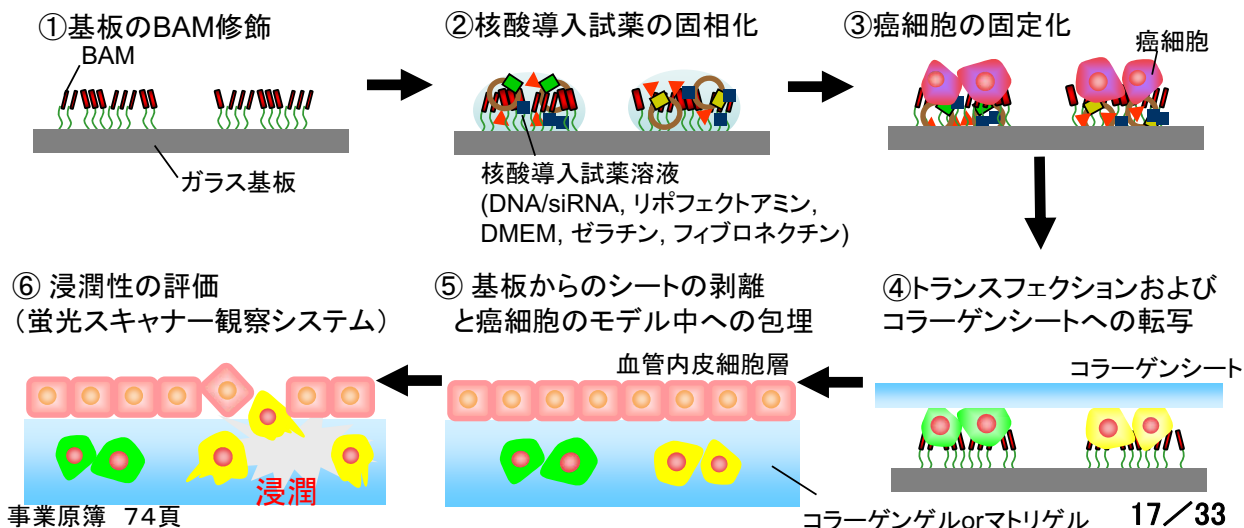
癌細胞浸潤性評価チップの開発

核酸導入細胞アレイ転写技術と癌細胞浸潤性評価技術の概要

セルアレイ技術で調製した**核酸導入癌細胞アレイ**を、**望みの環境場に転写**できれば、より生体内環境に近い条件化でのスクリーニングや遺伝子解析が可能になる！！

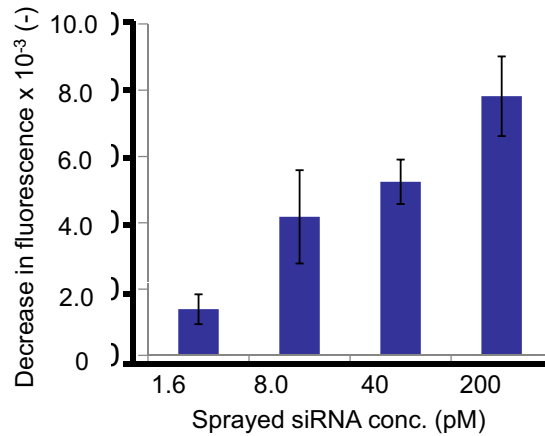
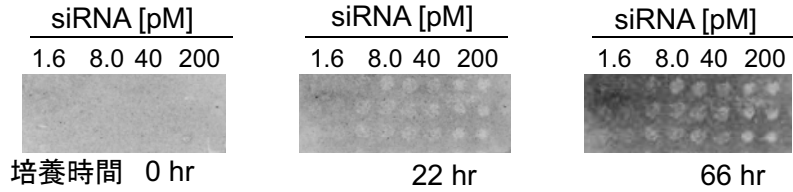
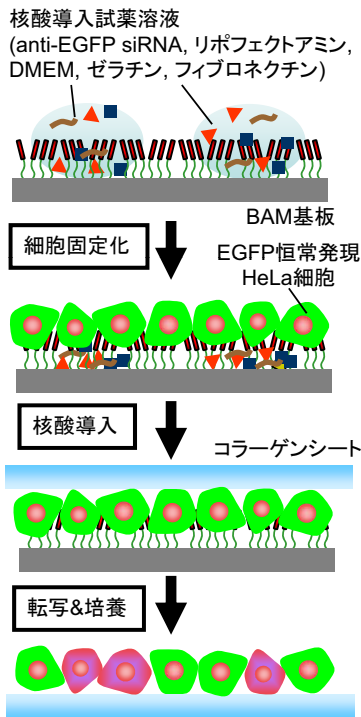
(本研究では、**siRNA導入癌細胞**を、**血管内皮モデルシート**中に転写する)

核酸導入細胞転写技術



癌細胞浸潤性評価チップの開発

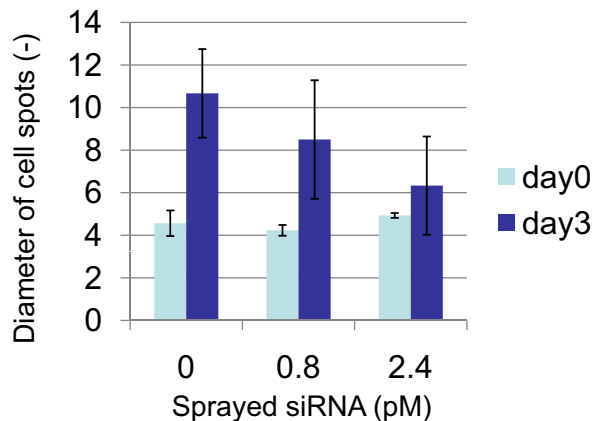
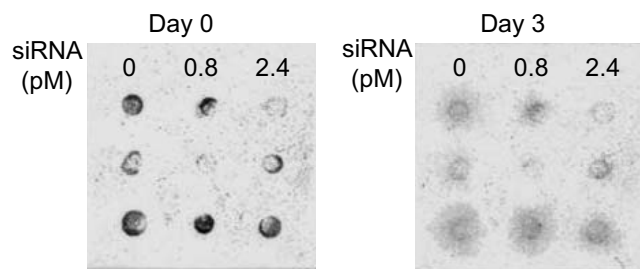
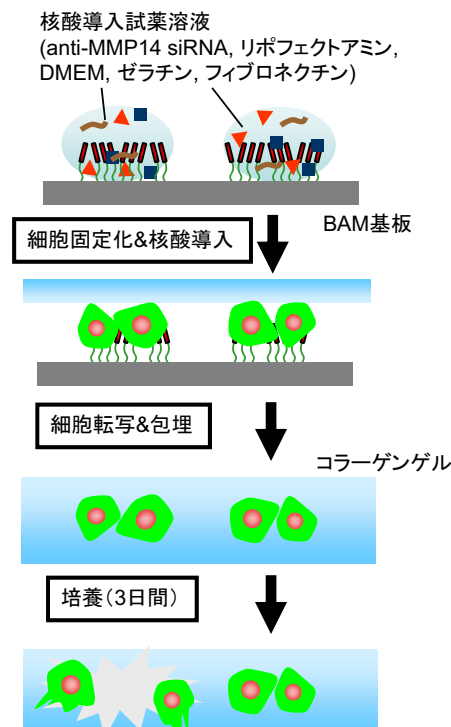
siRNA導入癌細胞のコラーゲンシートへの転写



固相化したsiRNA量に応じた蛍光のノックダウンを確認 18/33

癌細胞浸潤性評価チップの開発

モデルマトリクス内での浸潤性評価



anti-MMP siRNAの浸潤抑制効果の評価に成功 19/33

癌細胞浸潤性評価チップの開発

まとめ

- ・ 核酸導入細胞アレイをゲルシート上に転写する技術の開発
 - ⇒ プラスミドを導入した細胞の転写に成功
 - ⇒ siRNAを導入した細胞の転写に成功
- ・ モデルコラーゲンマトリクスにアレイした癌細胞の浸潤性を検討
 - ⇒ 浸潤性の高い癌細胞の拡散を可視化
- ・ siRNA導入細胞の浸潤性の評価に挑戦
 - ⇒ siRNAによる浸潤抑制の検出に成功



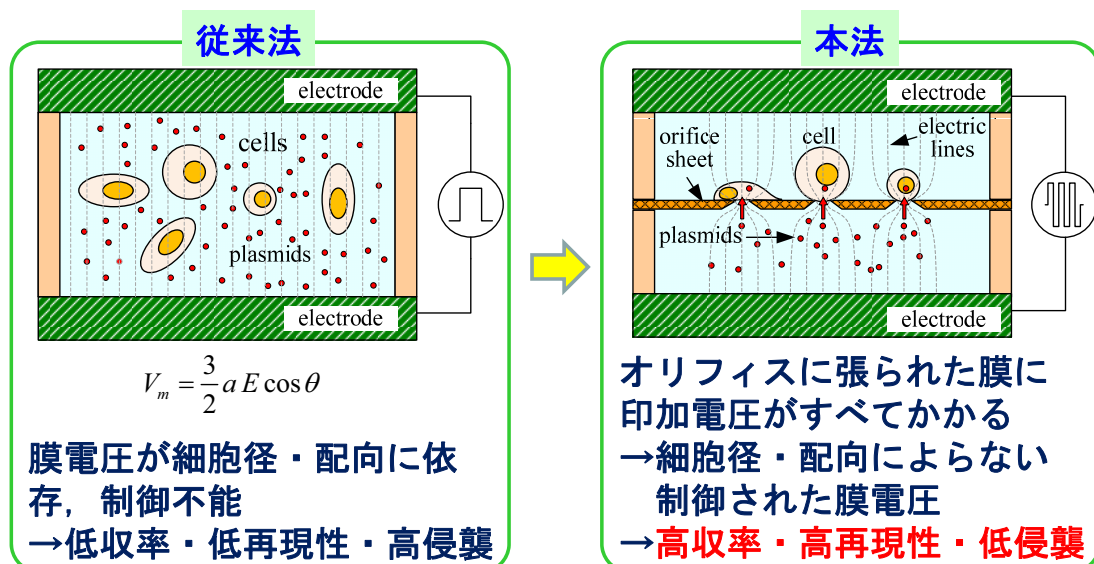
実用化への方向性

浸潤に関わる遺伝子や浸潤抑制効果を有するsiRNAやmicroRNAの網羅的スクリーニングを実施し、創薬支援技術となり得ることを示す

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

オンチップエレクトロポレーション法

目的：アレイ上で培養しても遺伝子導入効率が低い接着系細胞や浮遊系細胞への低侵襲かつ高効率な汎用的遺伝子導入技術の開発



低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

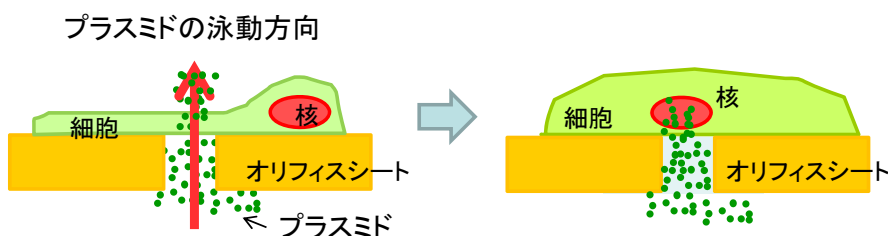
従来法の問題点

問題点：球形に近い細胞や、重層している細胞には入るが、疎にまかれた扁平に付着する細胞には入りにくい。

理由：扁平なため、プラスミドが通り抜けてしまい、核に到達できない

→ 媒質の導電率を下げる；電気泳動による濃縮効果

・核の直下にオリフィスが1個あるように、オリフィス密度を上げる。



事業原簿 86頁

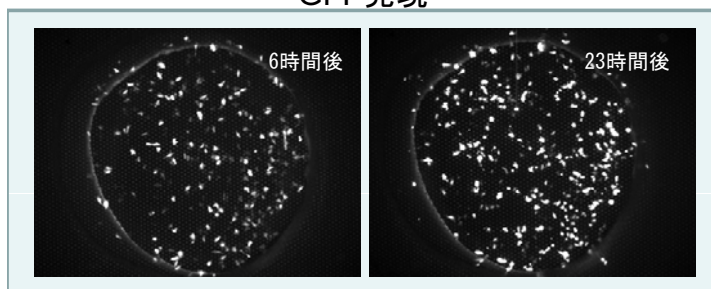
22 / 33

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

実験結果

電気泳動による濃縮効果

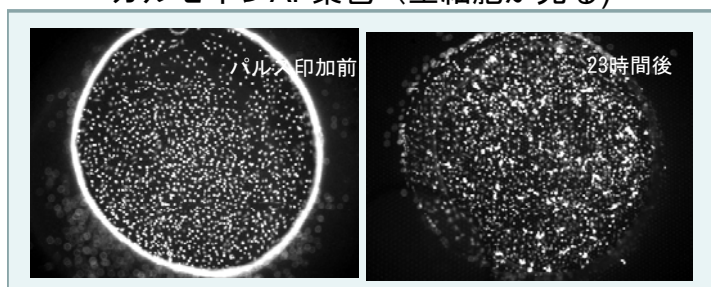
GFP発現



媒質：マンニトール溶液，濃度：150mM，
 導電率：1mS/cm（生理塩濃度～10mS/cm）
 細胞：MSC細胞，444個/mm
 パルス：3V，100msec矩形波，1分間隔で2回印加

- ・パルス印可後2時間くらいで、すでにGFPの発現が見られる
- ・細胞の10-20%程度でGFPが発現，

カルセインAF染色（生細胞が光る）



- ・23時間もパルス印加前とほぼ同じ生細胞数



電界集中型エレクトロポレーション法
 は細胞に対して低侵襲

23 / 33

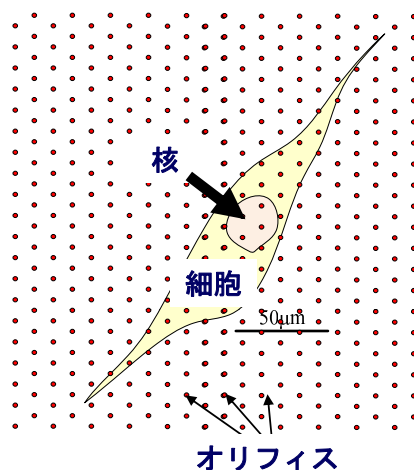
低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

高密度オリフィスの開発

電気泳動により核にプラスミドを導入すれば高発現率



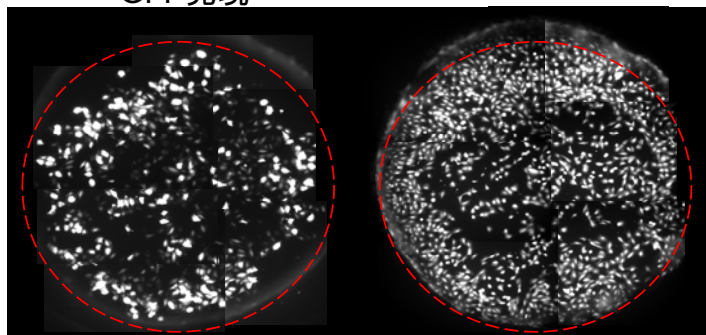
- ・核の直下に1つ以上のオリフィスがあり、かつ十分な電界集中が得られるよう、ピッチを最適化
- ・リソグラフィーによるオリフィスシート作製法の開発



実験結果

GFP発現

カルセイン染色
(生細胞が光る)

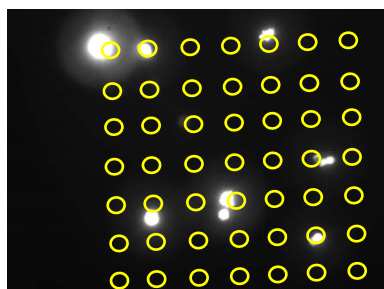
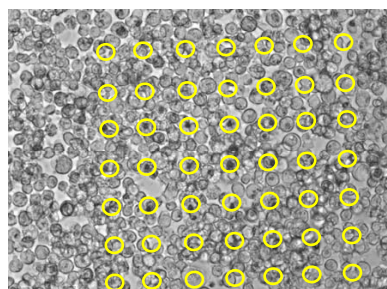
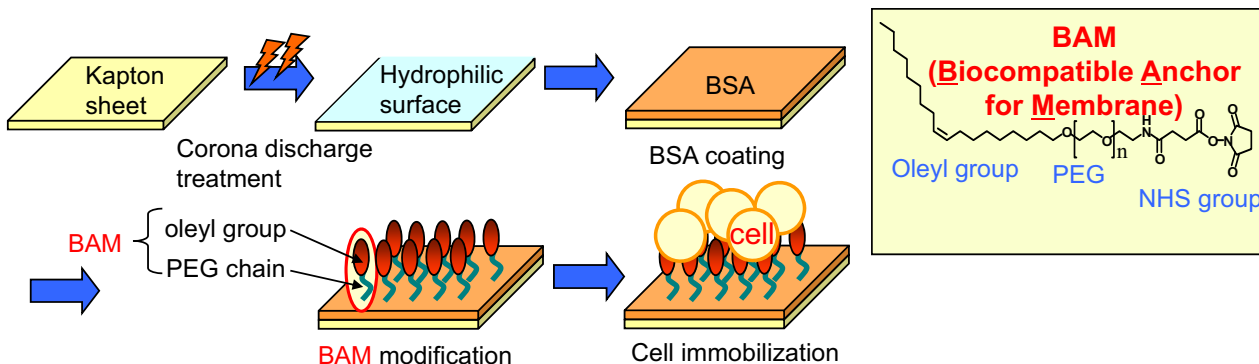


- ・数10%の導入率が安定して得られた
- ・パルス印加前とほぼ同じ生細胞数

媒質：マンニトール溶液、濃度：150mM、
 導電率：1mS/cm (生理塩濃度~10mS/cm)
 細胞：MSC細胞、444個/mm
 パルス：4V、200msec矩形波、単発

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

浮遊系細胞へのプラスミドの導入



細胞：K562
 プラスミド：200ng/µl pVirus-C1
 パルス：矩形波, 10V, 100msec, single

低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

まとめ

- ・ 導入メカニズムの解析と安定した高収率の実現(鷺津研担当)
 - 電界条件および絶縁膜の改良 ⇒ **遺伝子発現に成功**
 - 電気泳動による濃縮 ⇒ **導入効率の向上**
 - 高密度オリフィスの使用 ⇒ **大量並列化**
- ・ 浮遊性細胞への遺伝子導入条件の検討(長棟研担当)
 - 浮遊系細胞へ応用 ⇒ **遺伝子発現に成功**
 - 簡易流路を用いて並列化 ⇒ **異種遺伝子の並列同時導入に成功**

実用化への方向性

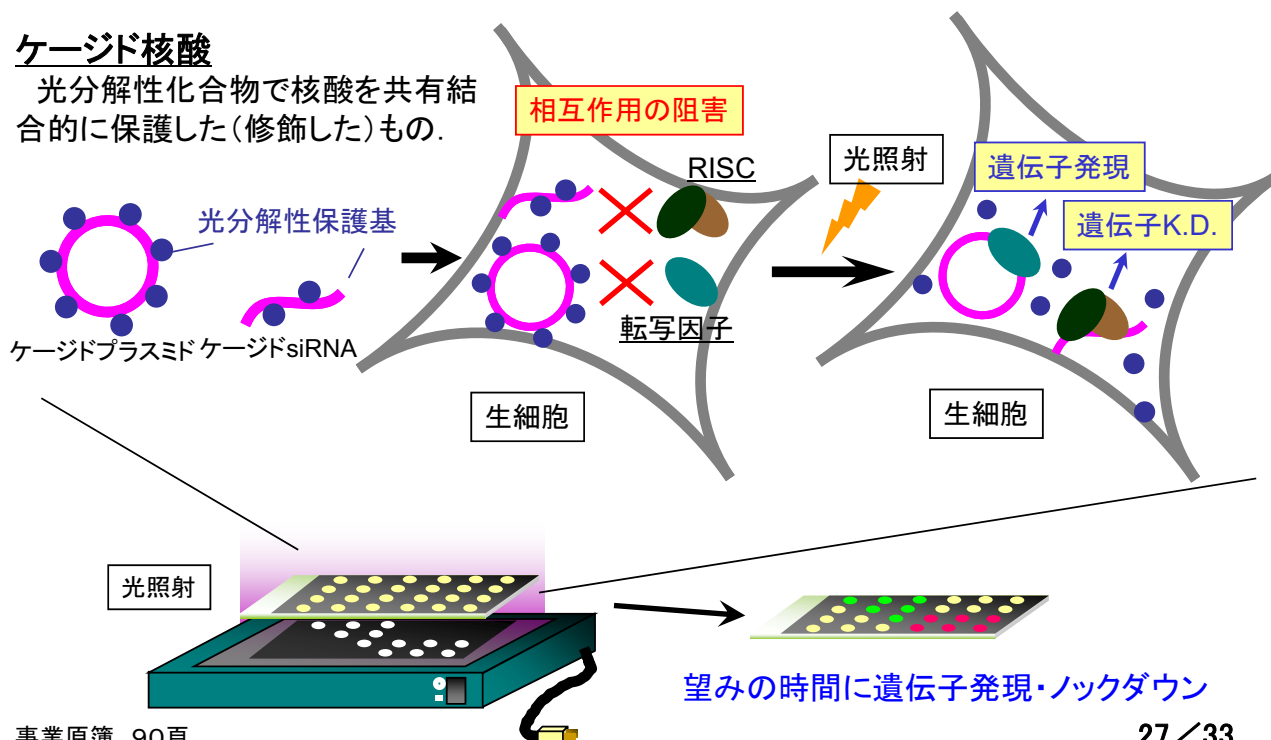
- ・ 接着性細胞を用いた検討によって改良された手法を、様々な種類の接着細胞や浮遊性細胞に応用し、汎用性を調べる。
- ・ 多種類の核酸試料を並列して同時に導入するために、微小チャンバーなどのMEMSデバイスを組み合わせる。

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

ケージド核酸を用いた遺伝子発現制御

ケージド核酸

光分解性化合物で核酸を共有結合的に保護した(修飾した)もの。



遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

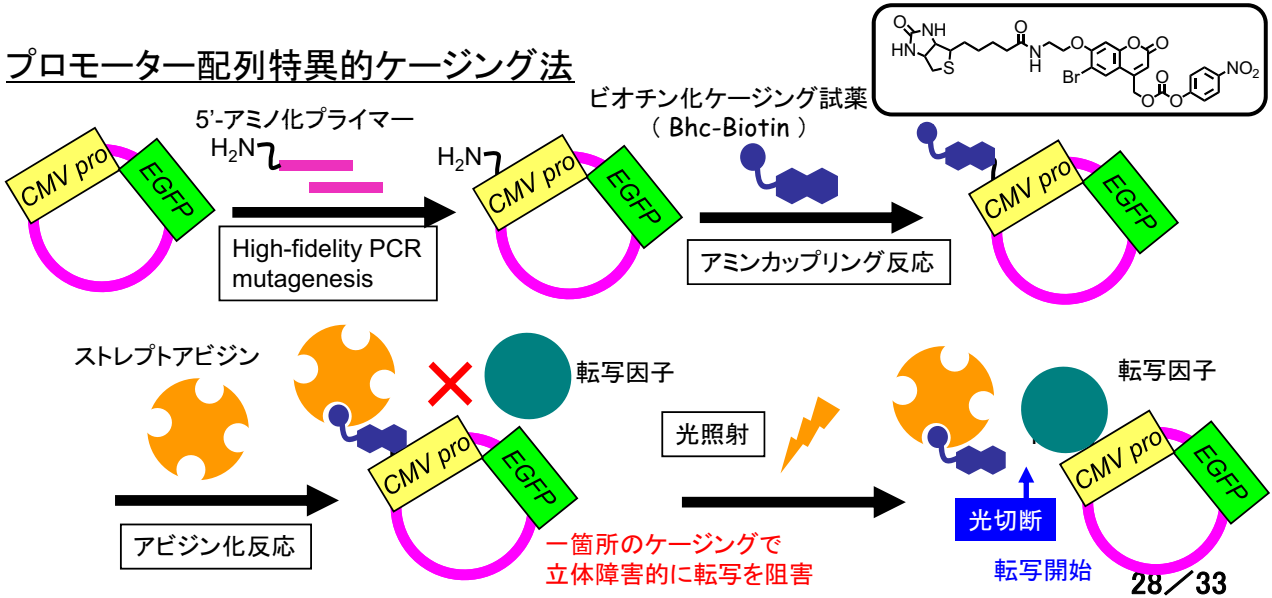
部位特異的ケージング法の概要



従来のランダム修飾型ケージドプラスミドの問題点

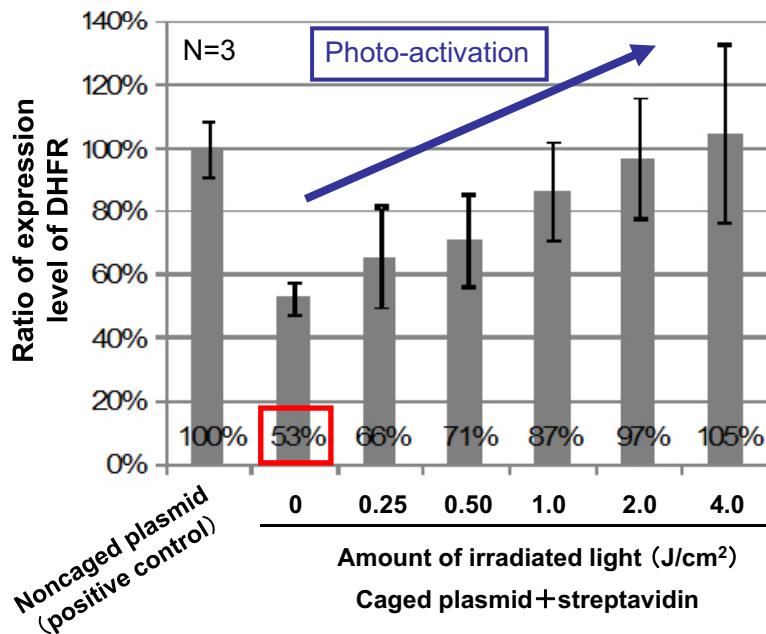
- ・ 光照射前の転写抑制率が低い
- ・ 転写を強く抑制するために過剰に修飾すると、光照射による発現誘導が不可能

プロモーター配列特異的ケージング法



遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

無細胞蛋白質合成系による評価

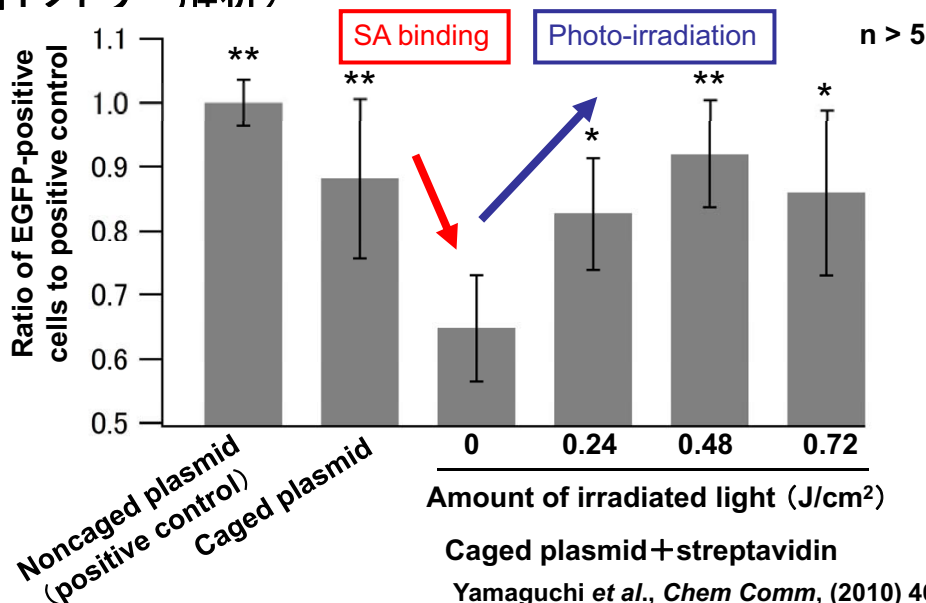


→ 光照射によって発現量を50~100%の範囲でコントロール可能!

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

遺伝子発現の光制御 (フローサイトメトリー解析)

細胞: HeLa細胞
培養時間: 遺伝子導入後24 h
光照射: 導入後2 h後に照射



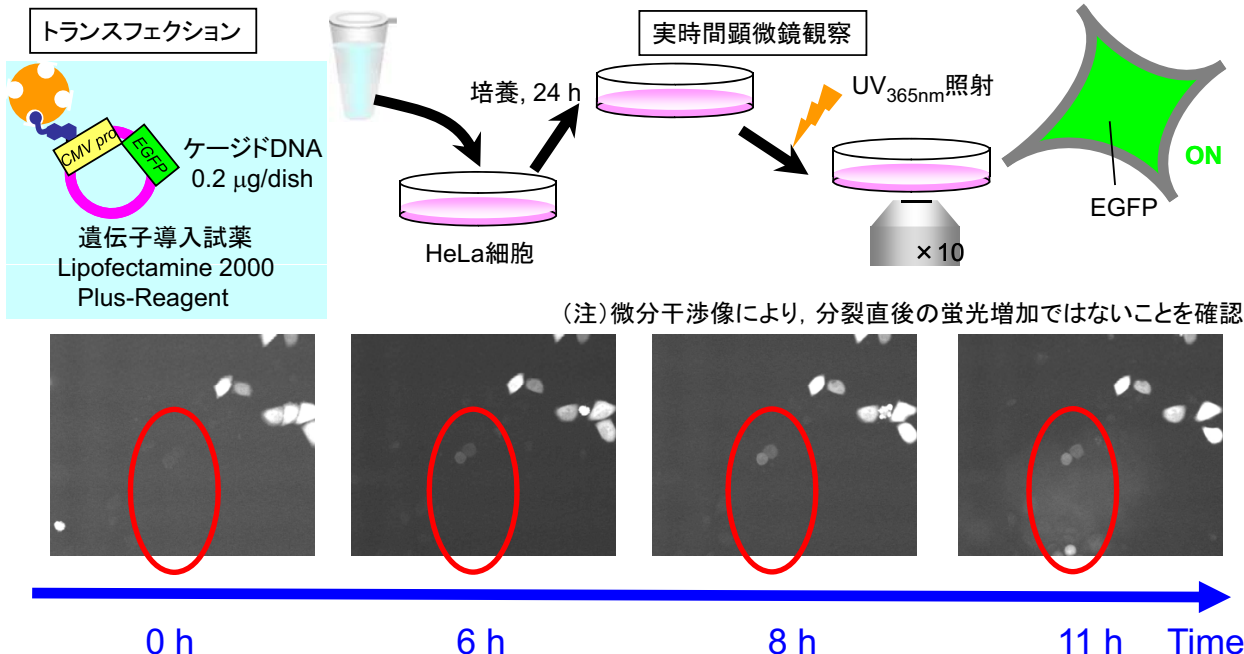
Yamaguchi et al., Chem Comm, (2010) 46, 2244

最大で抑制した陽性率の4分の3が光照射で回復

事業原簿 90頁 → 弱い光で遺伝子発現の活性化に成功!

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

実時間観察

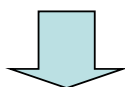


→ 画像解析を行うと, 光照射後全体的に蛍光が増加した

遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

まとめ

- ・ 部位特異的ケージドプラスミドの開発
 - ⇒ 微量の光照射によって**遺伝子発現の光活性化に成功**
- ・ 部位特異的ケージドプラスミドによる光発現誘導の実時間観察
 - ⇒ **光照射による発現誘導を確認**
- ・ 無細胞発現系による部位特異的ケージドプラスミドの性能評価と改良
 - ⇒ **精製により光照射前の遺伝子発現量を低減**
 - ⇒ **発現量を50 ~ 100%の範囲で光制御**



実用化への方向性

- ・ 光照射前の転写をより厳密に抑制する改良
- ・ 部位特異的ビオチン化ケージドDNAをshRNAの転写制御に応用
- ・ 実時間細胞蛍光観察装置およびその解析プログラムと組み合わせて、光照射後の遺伝子発現過程を定量的に解析

32 / 33

成果のまとめ(発表論文など)

1. 癌細胞浸潤・転移能評価デバイスの構築

【産総合研RICE・臨海グループ】

- 1) 特願2007-144215、特開2008-295351、WO2008/149809
- 2) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*, Lab Chip, (2008) 8, 1502
- 3) 長崎晃ら、生化学 (2009) 81, 381
- 4) Onuki-Nagasaki, R. *et al.*, Method in Mol. Biol., (2010) in press

【東大】

- 1) 長棟輝行ら、“細胞転写技術を用いた細胞アレイ作製技術”, 遺伝子医学MOOK別冊, pp.230-234 (2008)
- 2) 山口哲志ら、“医薬品スクリーニング用細胞アレイのための細胞固定化および細胞転写技術”, バイオ医薬の開発技術とシーズ(山本重夫 監修)、CMC出版, pp.90-99 (2009)

2. 低侵襲高効率な遺伝子導入デバイスの開発

- 1) Techaumnat, B. and Washizu, M., J. Phys. D: Appl. Phys. 40 1831-1837 (2007)
- 2) Washizu M. and Techaumna, B., IET Nanobiotechnology, Vol. 2, No. 3, p.62-71 (2008)
- 3) Kurosawa, O *et al.*, μ -TAS 2009, p.570-572 (2009)

3. 遺伝子発現・抑制の同期化技術の開発

- 1) Kawakami, T. *et al.*, ChemBioChem (2008) 9, 1583
- 2) Katayama, K. *et al.*, Chem. Commun. (2008) 5399
- 3) Hashiro, S. *et al.*, JACS (2009)131, 13569
- 4) Yamaguchi, S. *et al.*, Chem. Commun. (2010) 46, 2244

33 / 33

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

事業原簿 31頁

1/27

課題：時系列測定・解析技術開発

公開

産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター
中津井雅彦、油谷幸代、富永大介、堀本勝久、浅井潔
京都大学・化学研究所

阿久津達也

東京大学・工学部

徳元康人、袴田知己、三宅淳

目標：

生きた細胞内での刺激応答リン酸化cis-element活性化パスウェイの構造推定、動態解析、及びそれらの検証に基づく、創薬ターゲットの絞り込み技術を、産総研・CBRC、東大・三宅研、京都大学と連携し、開発する。

実施計画：

東大・三宅研が撮像した時系列画像データを数値化し、その数値データに基づき、活性化パスウェイを定量的に推定する技術をCBRCが開発し、さらにその結果に基づき創薬ターゲット絞り込みにつながる検証及び拡張技術を、CBRCと京都大学と連携して開発する。

事業原簿 31頁

2/27

背景

「生きた細胞」

- 環境にตอบสนองしたネットワークの変化
- 最小限に抑えた刺激
- 時系列計測

解析対象

「刺激応答リン酸化cis-element
活性化パスウェイ」

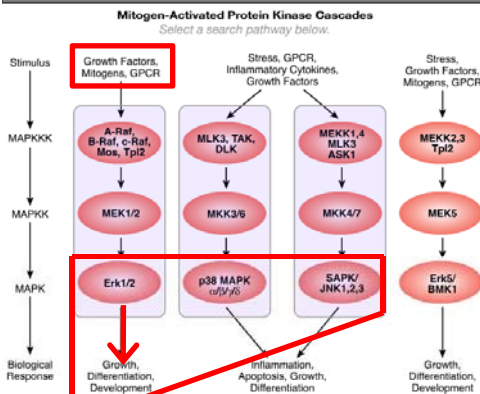
- 核内受容体(転写因子)
- 豊富な既知知見

技術課題

「絞り込み技術」

- 「時系列画像データを数値化」
- 「活性化パスウェイを定量的に推定」

- ①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術
- ②非計測分子を含むネットワーク動態解析
- ③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術



(方針)

既知パスウェイ
結果が確実に予測されるパスウェイ
技術の精度向上

(問題点)

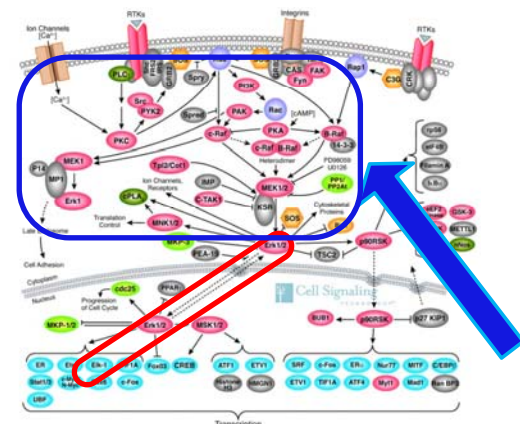
- 転写因子活性化の可視化が困難
- ①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術
- 計測分子が限定
- ②非計測分子を含むネットワーク動態解析

(出口)

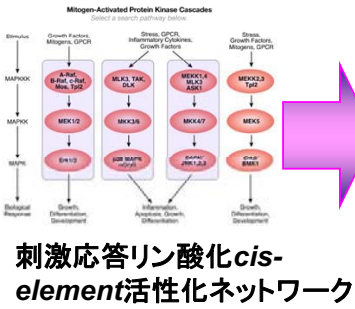
- 候補パス(ウェイ)
- 併用剤効果の定量評価

(進展)

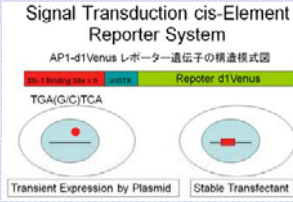
- 複雑なリン酸化カスケード
- ③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術



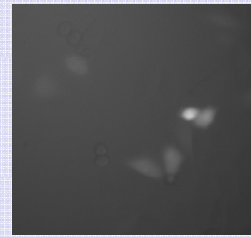
1) 解析対象の設定



2) レポーター遺伝子の作成と導入

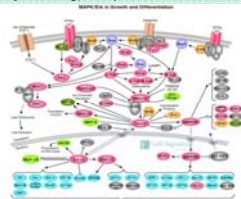


3) 時系列画像撮影



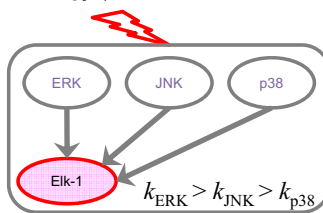
東大・三宅研

6) 推定結果の理論的検証と拡張



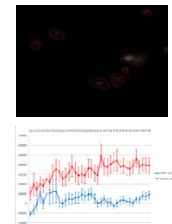
環境応答によるネットワーク変化追跡のための、③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術

5) 活性化ネットワークの推定



活性化パス予測のための、②非計測分子を含むネットワーク動態解析

4) 時系列画像の数値化

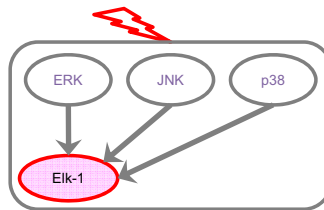


最小限刺激下の①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

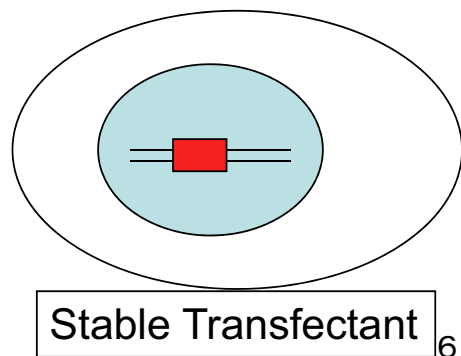
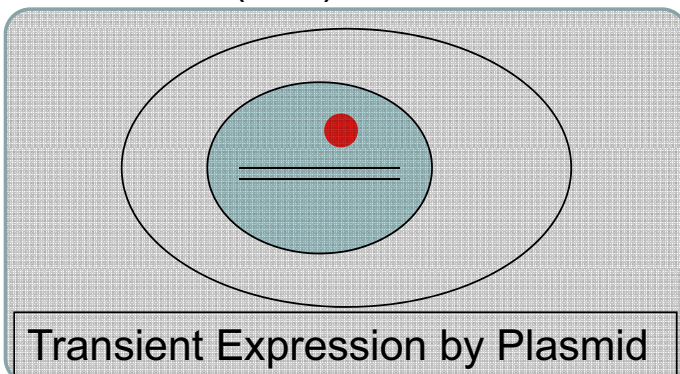
5/27

①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

Signal Transduction cis-Element Reporter System



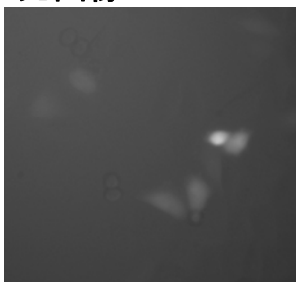
Elk1-d1Venus レポーター遺伝子の構造模式図



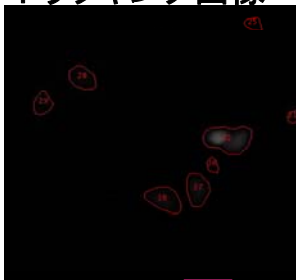
6/27

①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

元画像



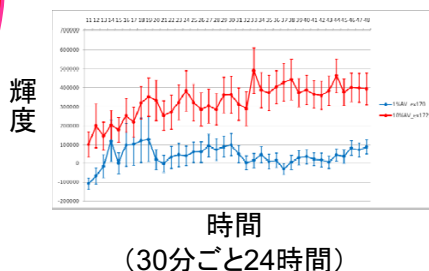
トラッキング画像



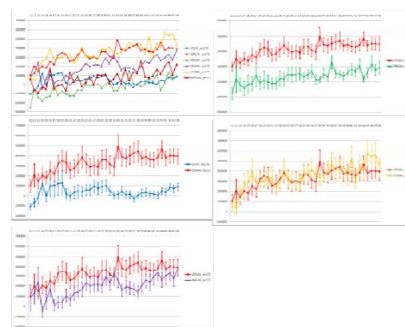
事業原簿 38頁

ハイスループット → 高精度

- 多重閾値設定による微弱蛍光の捕捉
- 細胞形状情報に基づくノイズ除去
- 時系列画像比較による細胞トラッキング
- 細胞トラッキングによる細胞総輝度の算出
- Offset値の算出と除去



時間 (30分ごと24時間)



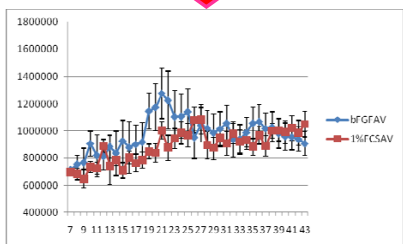
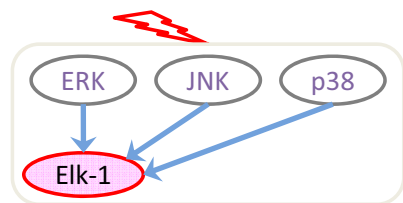
1回の撮像で96well (4スポット)の画像

数値化

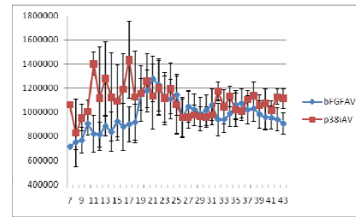
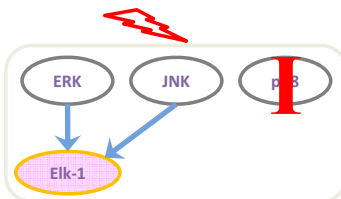
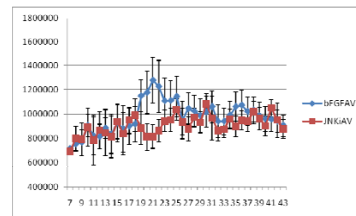
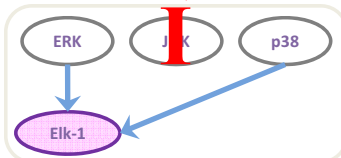
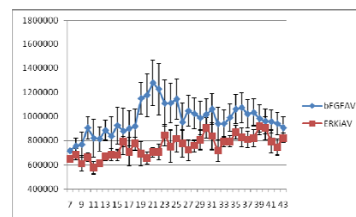
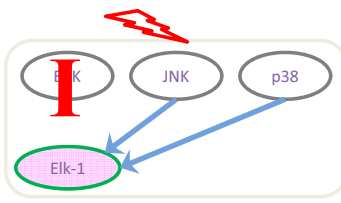
要素技術実証

bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

アッセイ



阻害剤添加



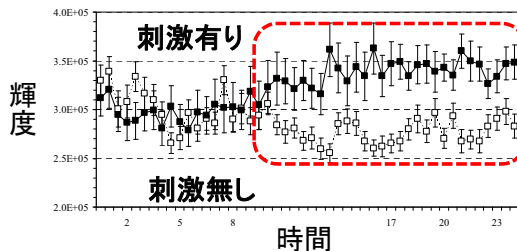
・転写因子リン酸化パスの定性的重みづけ

$$k_{ERK} > k_{JNK} > k_{p38}$$

bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

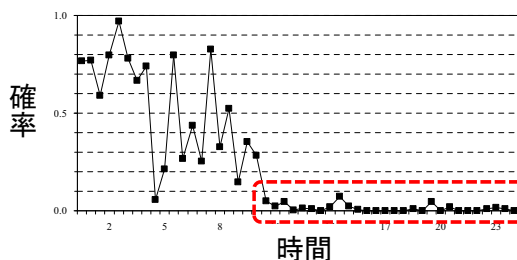
時系列画像数値化データの統計比較

◆各時点での細胞輝度の平均と標準誤差の算出



◆平均輝度のZ testによる各時点の輝度の検定

$$T = \frac{|AV^C - AV^E|}{\sqrt{\frac{VAR^C}{N^C} + \frac{VAR^E}{N^E}}} \sim N(0,1)$$

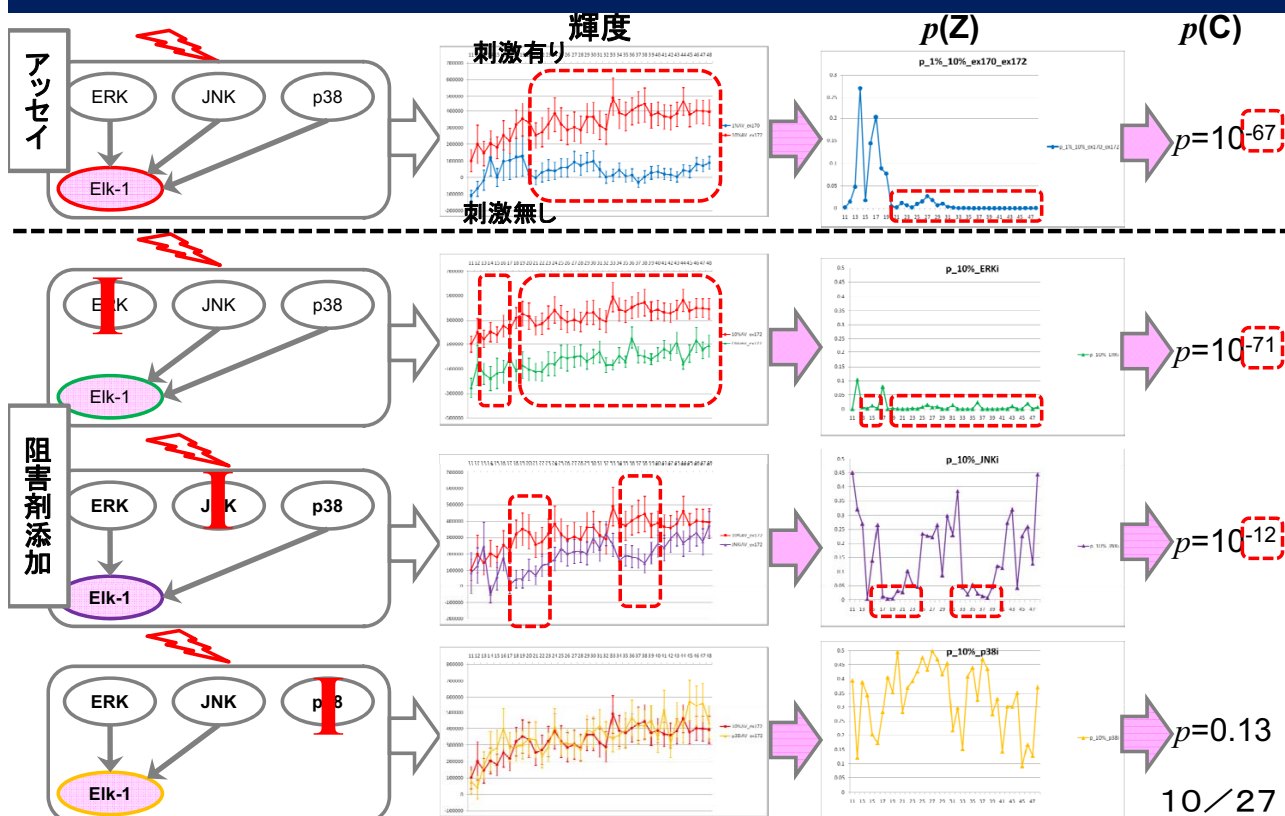


◆Z testによる確率のFisher's C testによる時系列輝度の検定

$$C = -2 \sum_{i=1}^k \ln(p_i) \sim \chi_{df=2k}^2$$

$$p = \chi_{df=2k}^2(C)$$

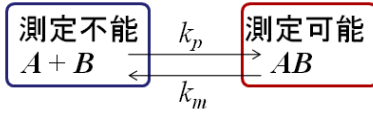
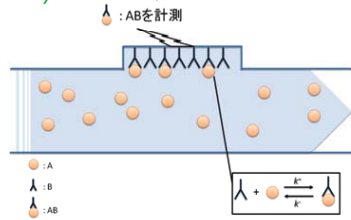
bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子



②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 問題点

公開

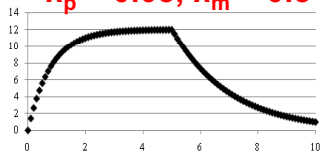
例) 結合と解離



$$\begin{cases} \frac{d[B]}{dt} = k_m[AB] - k_p[A][B] \\ \frac{d[AB]}{dt} = k_p[A][B] - k_m[AB] \end{cases}$$

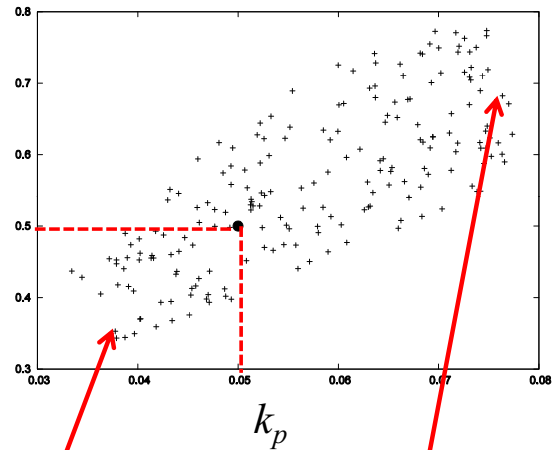
where $\begin{cases} [A] = a & \text{if } t \leq t_c \\ [A] = 0 & \text{otherwise} \end{cases}$

$k_p = 0.05, k_m = 0.5$

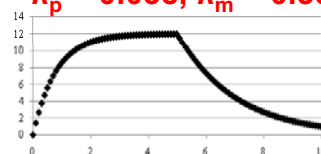


推定パラメータ値の不安定性

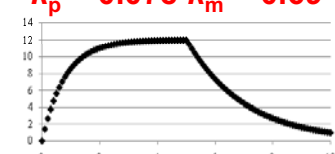
数値最適化



$k_p = 0.038, k_m = 0.33$



$k_p = 0.078, k_m = 0.69$



②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 アイデア

公開

制約条件を追加し、
反応パラメータの自由度を制限する

$$E = \sum_{i=1}^T \left| \frac{X_{1f}^{cal} - X_{1f}^{exp}}{X_{1f}^{exp}} \right| + ?$$

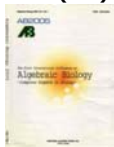
誤差関数

Differential Elimination

François Boulier, Differential Elimination and Biological Modelling, *Johann Radon Institute for Computational and Applied Mathematics (RICAM) Book Series*. Volume 2, pages 111-139, 2007.

Algebraic Biology

2005(1st)



Universal Academy Press
JPYen10,000

2007 (2nd)



LNCS 4545 from
Springer 52,00 €

2008(3rd)



LNCS 5147 from
Springer 45,00 €

Algebraic and Numeric Biology

Algebraic and Numeric Biology 2010

RISC, Castle of Hagenberg, Austria, July 31 - August 2

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 Differential Elimination (DE)

公開

- Rosenfeld-Gröbner
 - 微分を含む代数に関する理論
 - 微分方程式系を、他の等価な方程式系へと書き換える
- 例(Ritt Reduction)

u を消去

$$\begin{cases} \ddot{u} = v\dot{u} \\ \dot{u}^2 = -v \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} f_0 = \ddot{u} - v\dot{u} = 0 \\ g_0 = \dot{u}^2 + v = 0 \end{cases}$$

新しい制約条件として使用

$$\dot{g}_0 = 2\dot{u}\ddot{u} + \dot{v} = 0$$

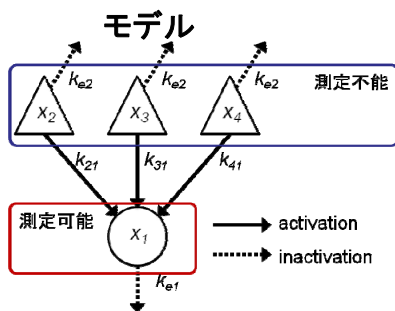
$$f_0 \xrightarrow{\dot{g}_0} f_0 - \frac{\ddot{u}}{2\dot{u}\ddot{u}} \dot{g}_0 = \ddot{u} - v\dot{u} - \frac{2\dot{u}\ddot{u}}{2\dot{u}} - \frac{\dot{v}}{2\dot{u}} = -v\dot{u} - \frac{\dot{v}}{2\dot{u}} = f_1 = 0$$

$$f_2 = -2v\dot{u}^2 - \dot{v} = 0$$

$$f_2 \xrightarrow{g_0} f_2 - \frac{-2v\dot{u}^2}{\dot{u}^2} g_0 = -2v\dot{u}^2 - \dot{v} + 2v\dot{u}^2 + 2v^2 = -\dot{v} + 2v^2 = 0$$

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DEによる等号制約

公開



微分方程式モデル

$$\begin{cases} \frac{dx_1}{dt} = k_{21}x_2 + k_{31}x_3 + k_{41}x_4 - k_{e1}x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} = -k_{e2}x_2 - k_{21}x_2 \\ \frac{dx_3}{dt} = -k_{e2}x_3 - k_{31}x_3 \\ \frac{dx_4}{dt} = -k_{e2}x_4 - k_{41}x_4 \end{cases}$$

数値最適化法の評価関数

$$\begin{cases} C_{1,r} = \frac{1.0}{k_{21}(k_{21}-k_{31})(k_{21}-k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{31}+k_{41}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ \left. + (k_{31}k_{41}+k_{31}k_{e1}+k_{41}k_{e1}+k_{31}k_{e2}+k_{41}k_{e2}+2k_{e1}k_{e2}+k_{e2}^2) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ \left. + k_{e1}(k_{31}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) - k_{21}(k_{21}-k_{31})(k_{21}-k_{41})x_2(t) \right) = 0 \\ C_{2,r} = \frac{1.0}{(k_{21}-k_{31})k_{31}(k_{31}-k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{21}+k_{41}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ \left. + (k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{21}(k_{41}+k_{e1}+k_{e2})+k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2})) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ \left. + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) + x_3(t) \right) = 0 \\ C_{3,r} = \frac{1.0}{(k_{21}-k_{41})(k_{31}-k_{41})k_{41}} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{21}+k_{31}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ \left. + (k_{21}k_{31}+k_{21}k_{e1}+k_{31}k_{e1}+k_{21}k_{e2}+k_{31}k_{e2}+2k_{e1}k_{e2}+k_{e2}^2) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ \left. + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{31}+k_{e2})x_1(t) + (k_{21}-k_{41})k_{41}(-k_{31}+k_{41})x_4(t) \right) = 0 \\ C_{4,r} = \frac{d^4}{dt^4}x_1(t) + (k_{21}+k_{31}+k_{41}+k_{e1}+3k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3}x_1(t) \\ + (k_{21}k_{31}+k_{21}k_{41}+k_{31}k_{41}+k_{21}k_{e1}+k_{31}k_{e1}+k_{41}k_{e1} \\ + 2k_{21}k_{e2}+2k_{31}k_{e2}+2k_{41}k_{e2}+3k_{e1}k_{e2}+3k_{e2}^2) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \\ + (k_{31}(k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2}))+k_{21}(k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{31}(k_{41}+k_{e1}+k_{e2})) \\ + k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2}))+k_{e2}(k_{41}(2k_{e1}+k_{e2}))+k_{e2}(3k_{e1}+k_{e2})) \frac{d}{dt}x_1(t) \\ + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{31}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) = 0 \end{cases}$$

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DE等号制約の算出

公開

$$C_1 = k_{21}, k_{31}, k_{41}, k_{e1}, k_{e2}$$

: 推定された反応パラメータ.

$$C_2 = x_1(t)$$

: 測定された時系列データ

$$C_3 = \frac{d}{dt} x_1(t), \frac{d^2}{dt^2} x_1(t), \frac{d^3}{dt^3} x_1(t), \frac{d^4}{dt^4} x_1(t)$$

: 測定データから

解析的に求められない場合は、
数値的に計算した値を使用することも可能

$$C_4 = x_2(t), x_3(t), x_4(t)$$

: ネットワークモデルの微分方程式から
解析的に求めたもの

$C_{1,t}, C_{2,t}, C_{3,t}, C_{4,t}$ の値を、各サンプリングポイント t について計算

15/27

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DE等号制約の評価

公開

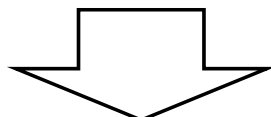
C_t (サンプリング時刻 t における制約条件の値)

$$C = \sum_{t=1}^T (C_t) \quad \text{DE Constraints}$$

ここで $C_t = |C_{1,t}| + |C_{2,t}| + |C_{3,t}| + |C_{4,t}|$

C は反応パラメータ ($k_{21}, k_{31}, k_{41}, k_{e1}, k_{e2}$) の関数である

真の反応パラメータ及び時系列データ、導関数が与えられたとき、 $C=0$ である



C を最小化する反応パラメータを求める

16/27

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 新規開発法の概要

公開

従来法

- 誤差関数

$$E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right|$$

新規開発法(記号・数値最適化)

- E + 新規制約式(DE)

$$E' = \alpha \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right|$$

$$+ (1-\alpha) \sum_{t=1}^T (|C_1| + |C_2| + |C_3| + |C_4|)$$

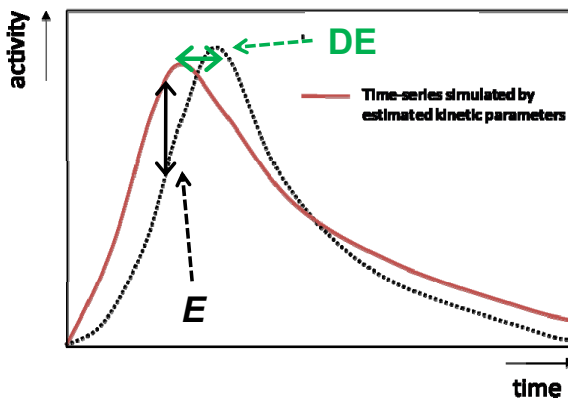
α : 重み

代数算法による新規制約式の導入

微分可能であればすべてのモデルに適用可能

工学分野への波及が期待される
汎用推定精度向上法

従来法と新規開発法との直感的比較

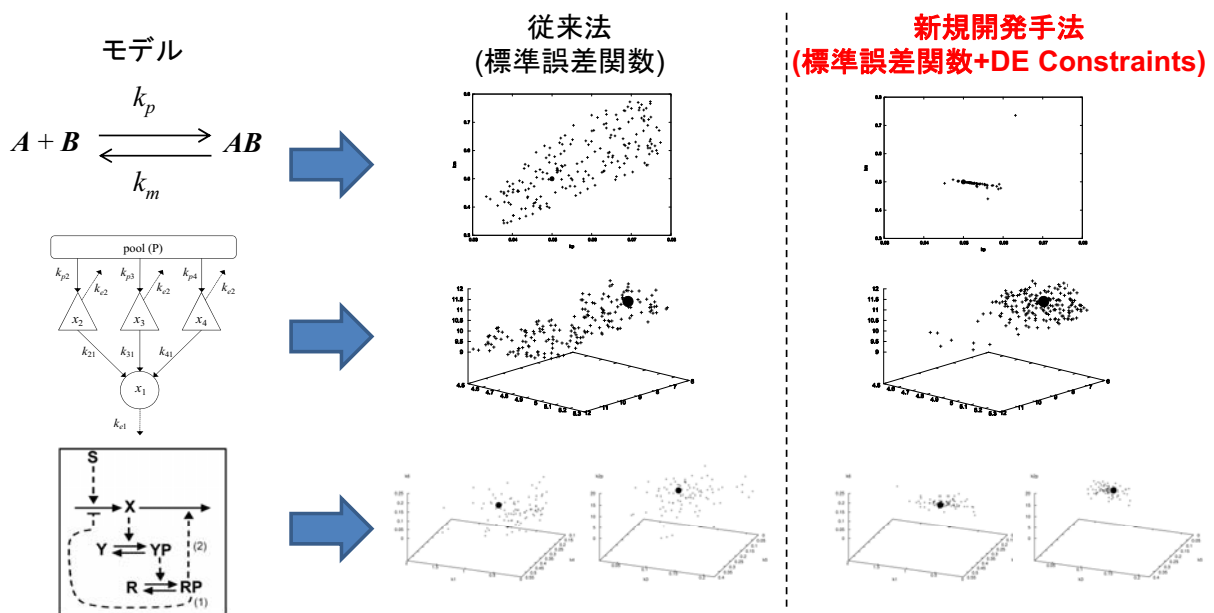


17/27

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 シミュレーション 1

公開

パラメータ推定精度の比較



圧倒的な精度を実現

- Proc. of OSB2009, pp. 245-253, 2009.
- Proc. of ISB2010, in press.
- BMC Sys. Biol. in press.
- IET Sys. Biol. in press

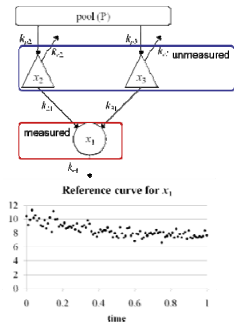
- より複雑なモデルへの対応 → Dr. Boulierグループ (Lille Univ., France)と共同研究
- 実問題への適用 → 九大・生防研、韓国科学院と共同研究

18/27

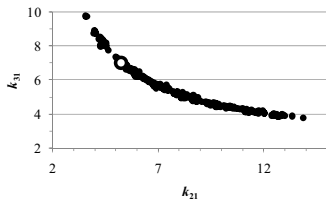
②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 シミュレーション 2

公開

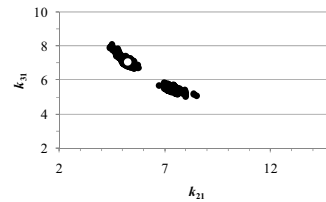
ノイズの含むデータ



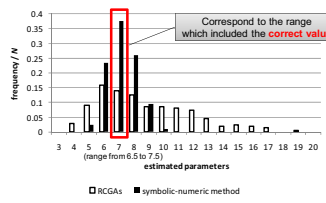
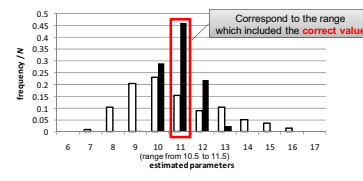
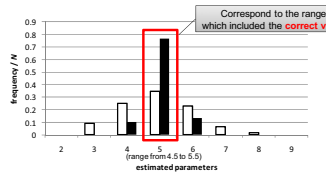
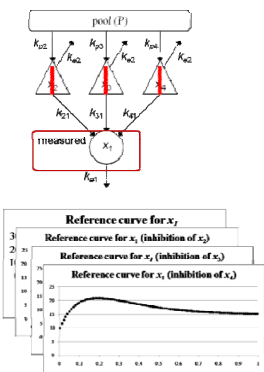
従来法
(標準誤差関数)



新規開発手法
(標準誤差関数+DE Constraints)

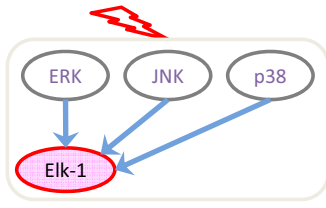
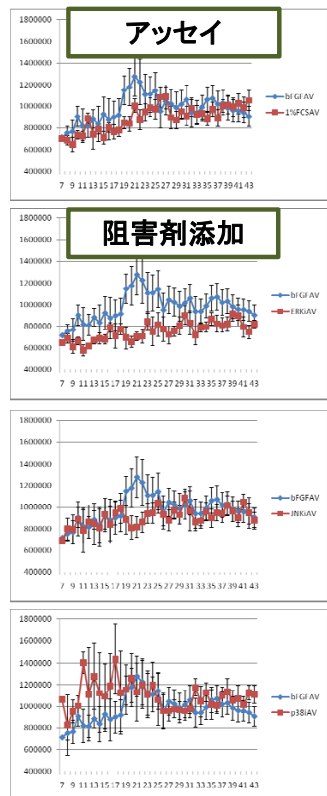


阻害剤を仮定したデータ



要素技術実証 bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

公開



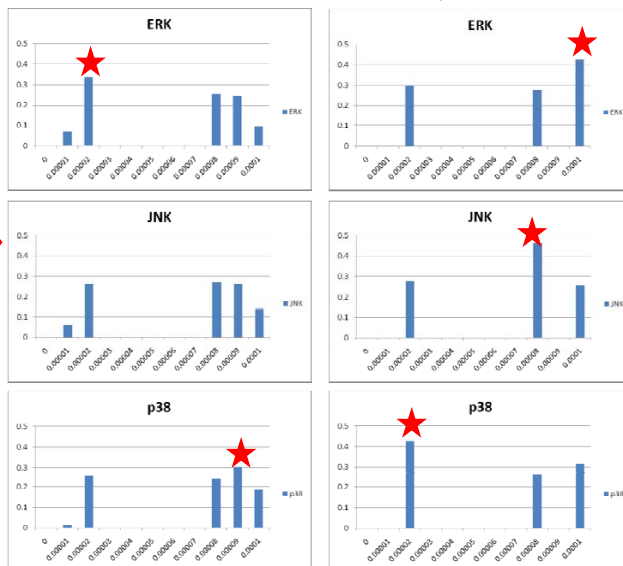
定性的結果を定量的結果で検証
→ 高精度シミュレーション

?

従来法

$$k_{ERK} > k_{JNK} > k_{p38}$$

新規開発法

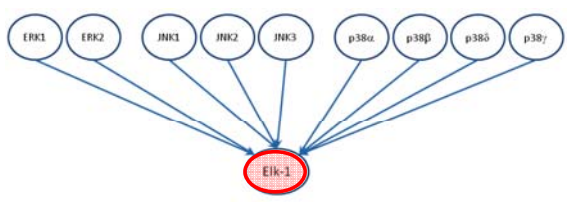


• Proc. Of OSB2009, pp. 245-253, 2009.
• BMC Sys. Biol. in press.
• IET Sys. Biol. in press

要素技術実証

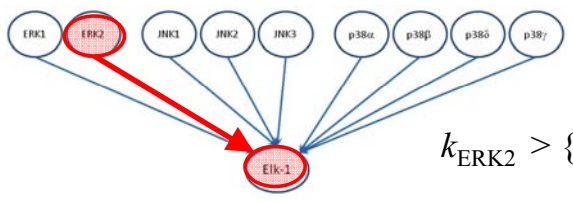
bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

モデル



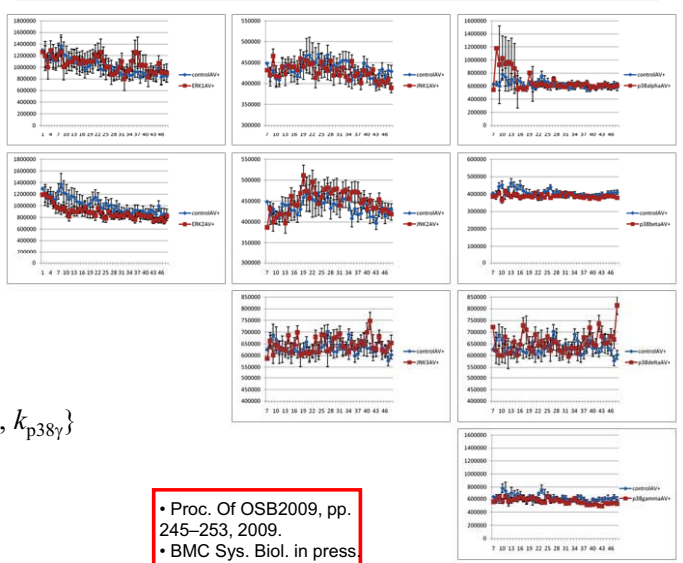
9遺伝子に対するsiRNA干渉実験下でElk-1の時系列計測データから、9パラメータを推定

$$\{k_{ERK1}, k_{ERK2}, k_{JNK1}, k_{JNK2}, k_{JNK3}, k_{p38\alpha}, k_{p38\beta}, k_{p38\delta}, k_{p38\gamma}\}$$



$$k_{ERK2} > \{k_{ERK1}, k_{JNK1}, k_{JNK2}, k_{JNK3}, k_{p38\alpha}, k_{p38\beta}, k_{p38\delta}, k_{p38\gamma}\}$$

siRNAによる干渉実験計測値



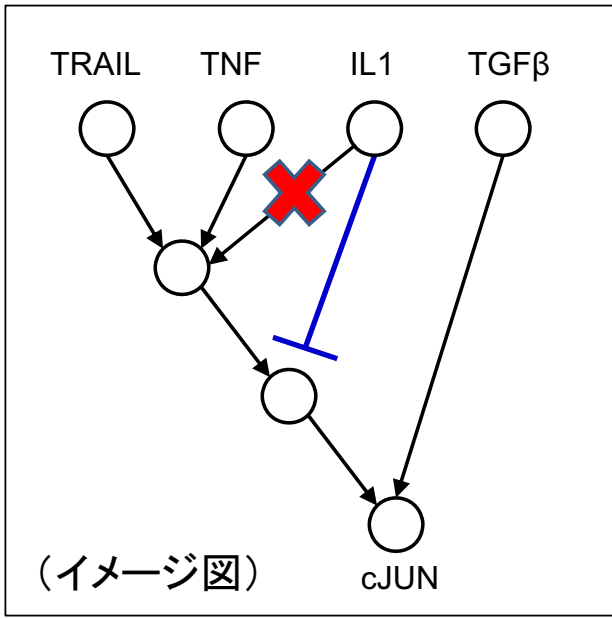
• Proc. Of OSB2009, pp. 245–253, 2009.
 • BMC Sys. Biol. in press
 • IET Sys. Biol. in press

③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術

ネットワーク補完技術

- 現在のネットワークに最小の修正を行って実験結果と一致するようにする

	cJUN (現ネットワーク)	cJUN (実験結果)
TRAIL	○	○
TNF	○	○
IL1	○	×
TGFβ	○	○

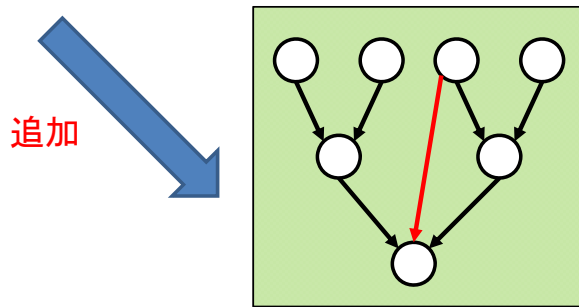
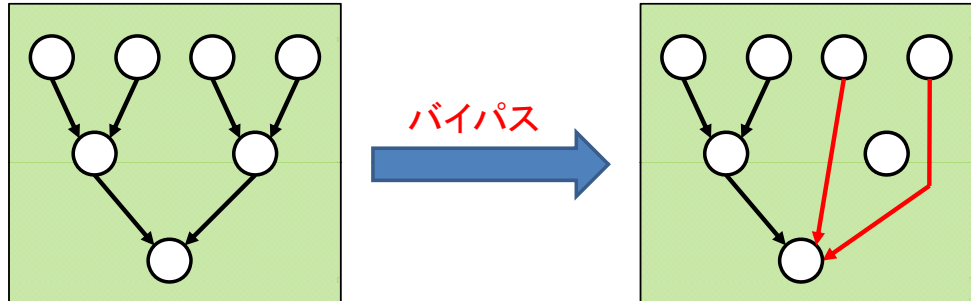


③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術 公開

ネットワーク補完技術

二種類の補完

- 頂点の**バイパス**(ノイズが多すぎる場合)
- 辺の**追加**(新たな関係の追加)



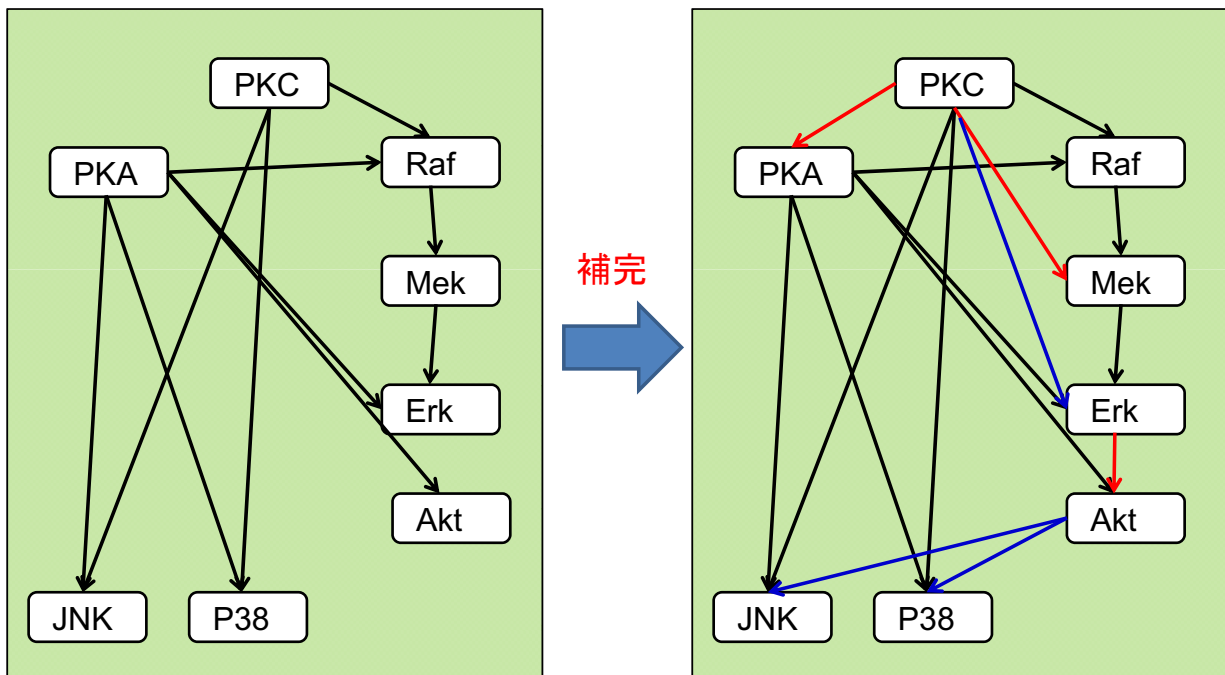
頂点ごとに可能な補完を試して、最も実験データとの誤差が少なくなった補完結果を採用

23 / 27

③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術 公開

ネットワーク補完技術

シグナル伝達ネットワークへの適用



→ ほぼ確実

→ 可能性あり

24 / 27

刺激応答リン酸化cis-elementに関して、
生きた細胞内で活性化ネットワークの同定
を可能にする新要素技術を開発した。

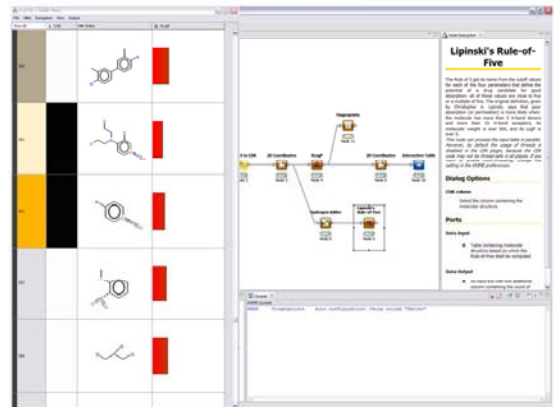
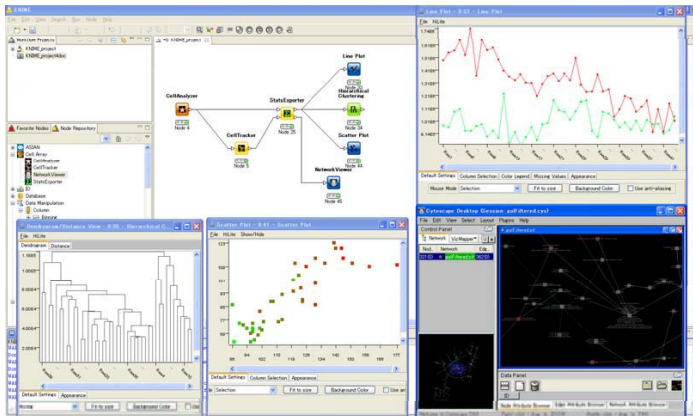


要素技術に基づく解析ソフトウェア

1. 「細胞組織の連続動画画像情報からの高精度特徴抽出システム」
2. 「Cell Array KNIMEワークフロー」

KNIME化による解析の可視化と利便性の向上

KNIME化によるChem-Bio解析への拡張



成果と実用化可能性

成果

- 特許 2
- 論文 97
- 学会発表・講演 78

実用化可能性

- ①細胞組織の連続動画画像情報からの高精度特徴抽出システム
 - ・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 Cell Array KNIMEワークフロー
 - ・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。
 - ・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。

事業原簿 45頁

27 / 27

「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7-3

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

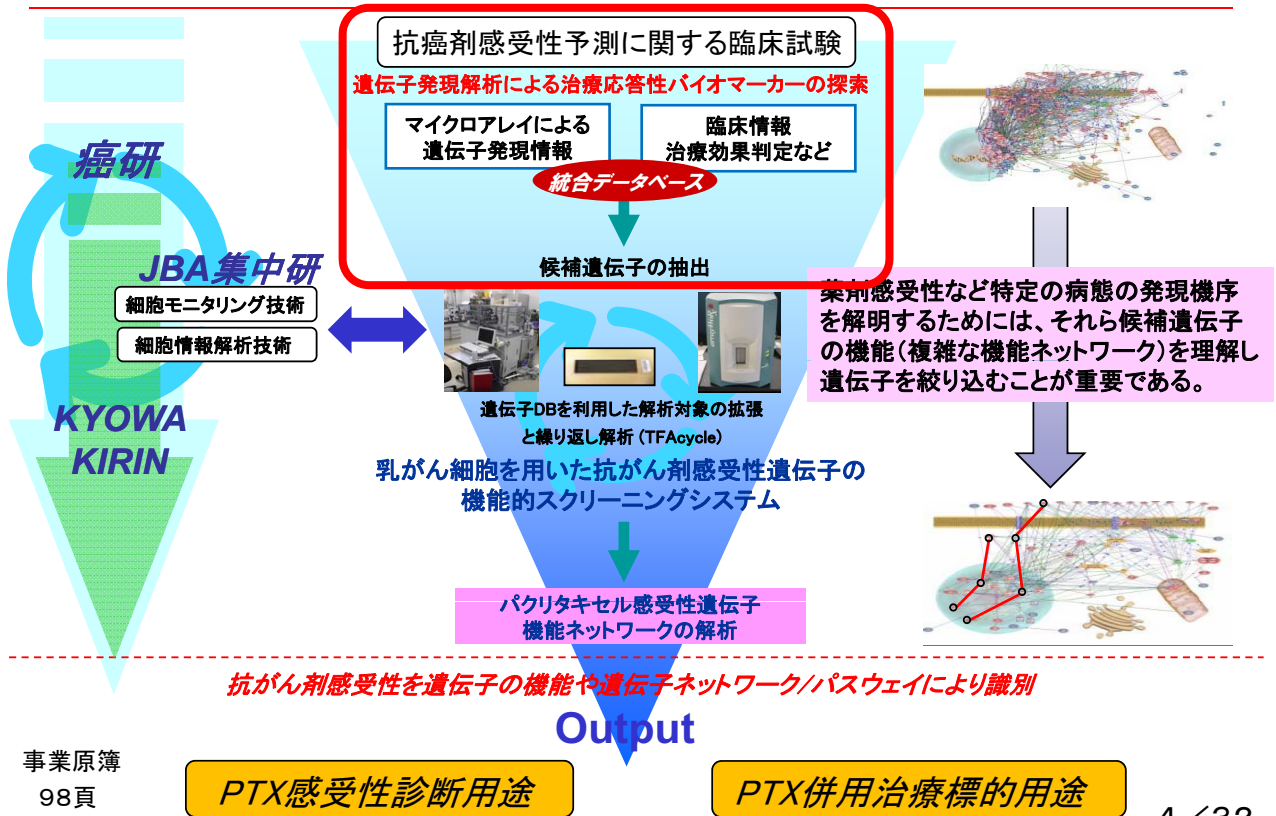
- ・ パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索
(癌研究会、協和発酵キリン)
- ・ パスウェイ解析を応用した機能性化粧品の開発(カネボウ化粧品)

応用研究

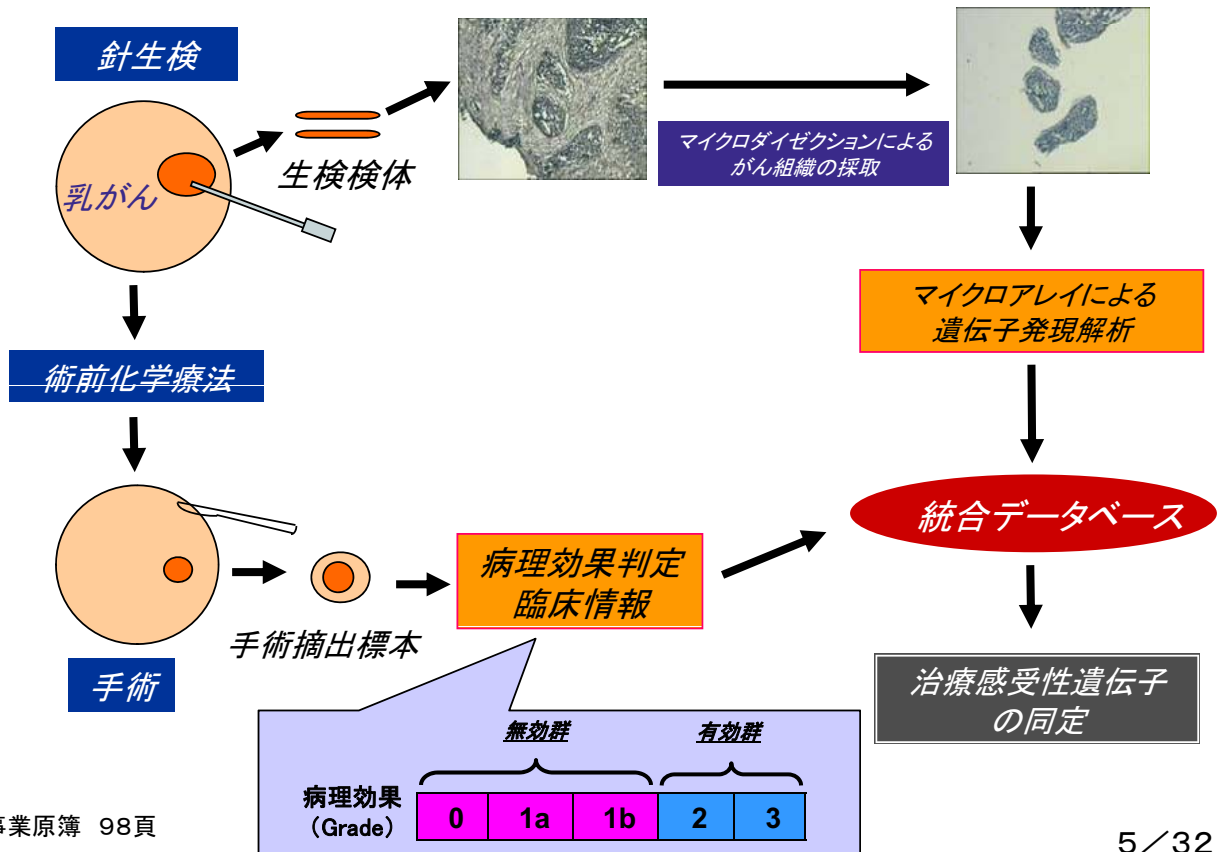
創薬ターゲット同定技術ケーススタディー (癌研究会、協和発酵キリン)

- 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

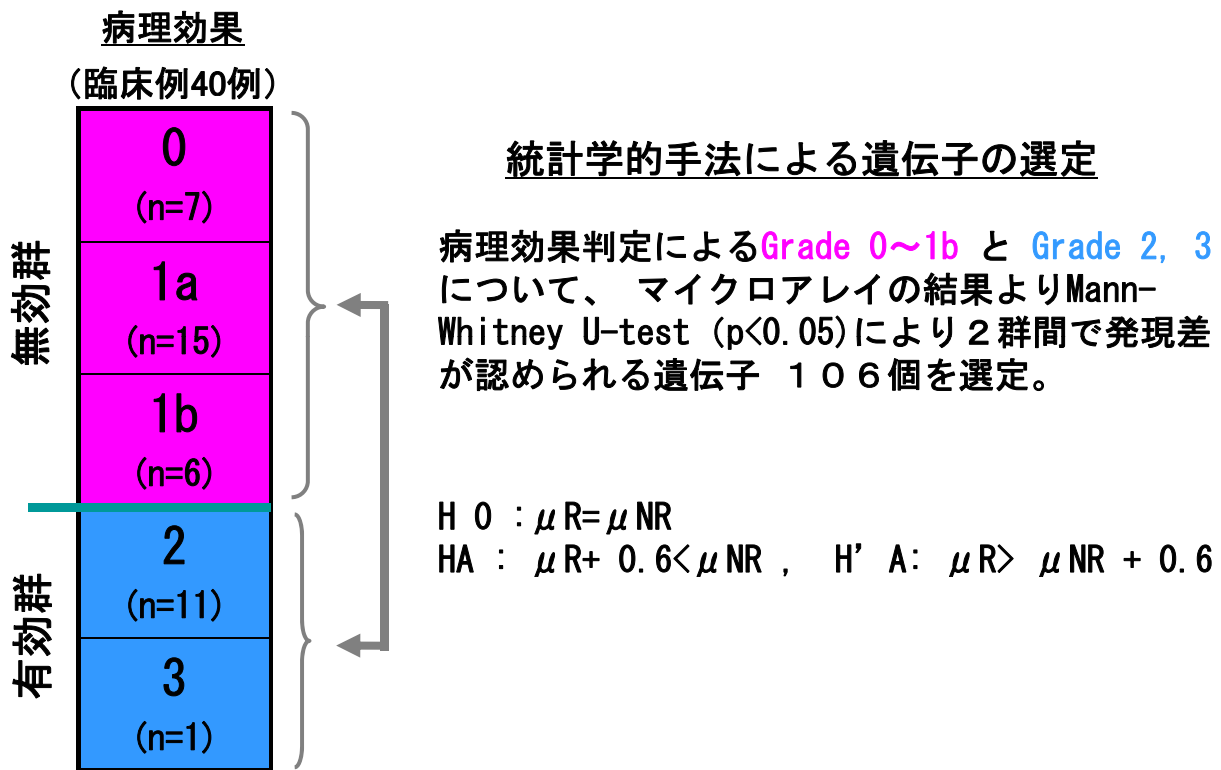
パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索



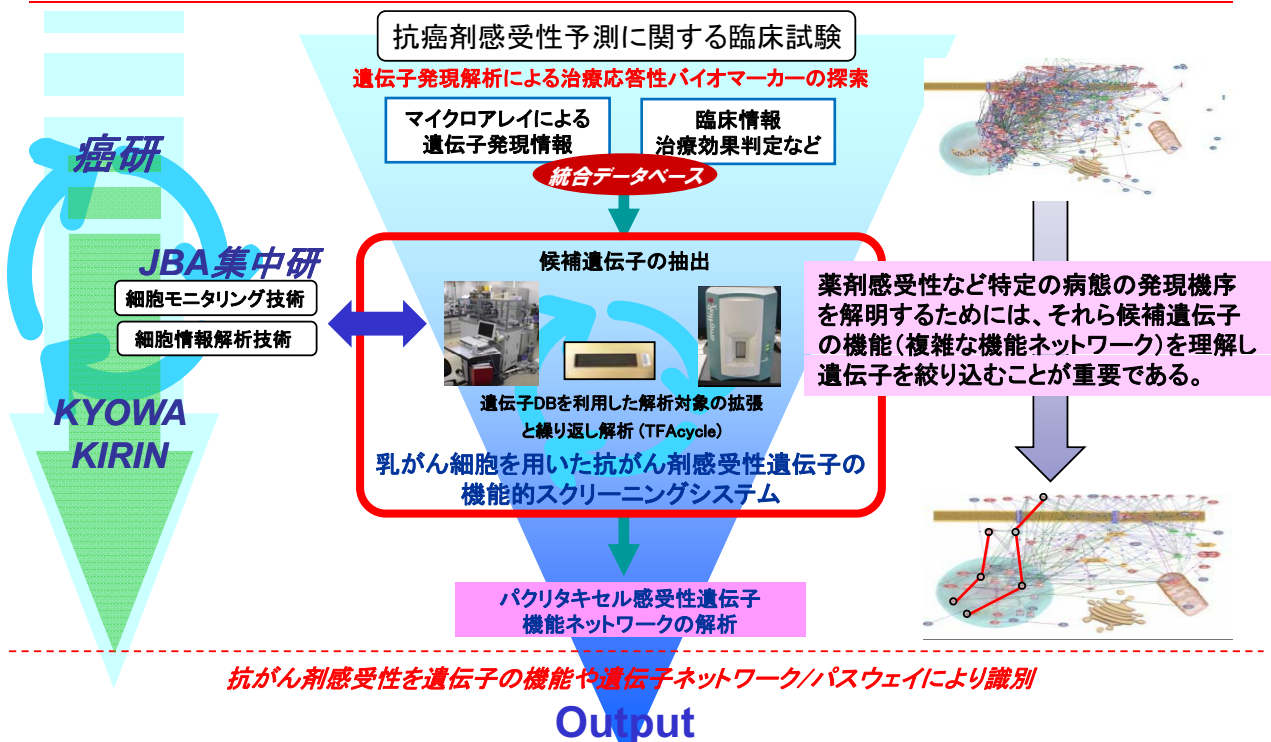
乳がん術前抗がん剤感受性予測に関する臨床試験



遺伝子発現プロファイルによる候補遺伝子の選定



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



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



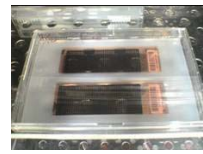
固相ウェルベースで検討



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



Array WorX (Amersham)

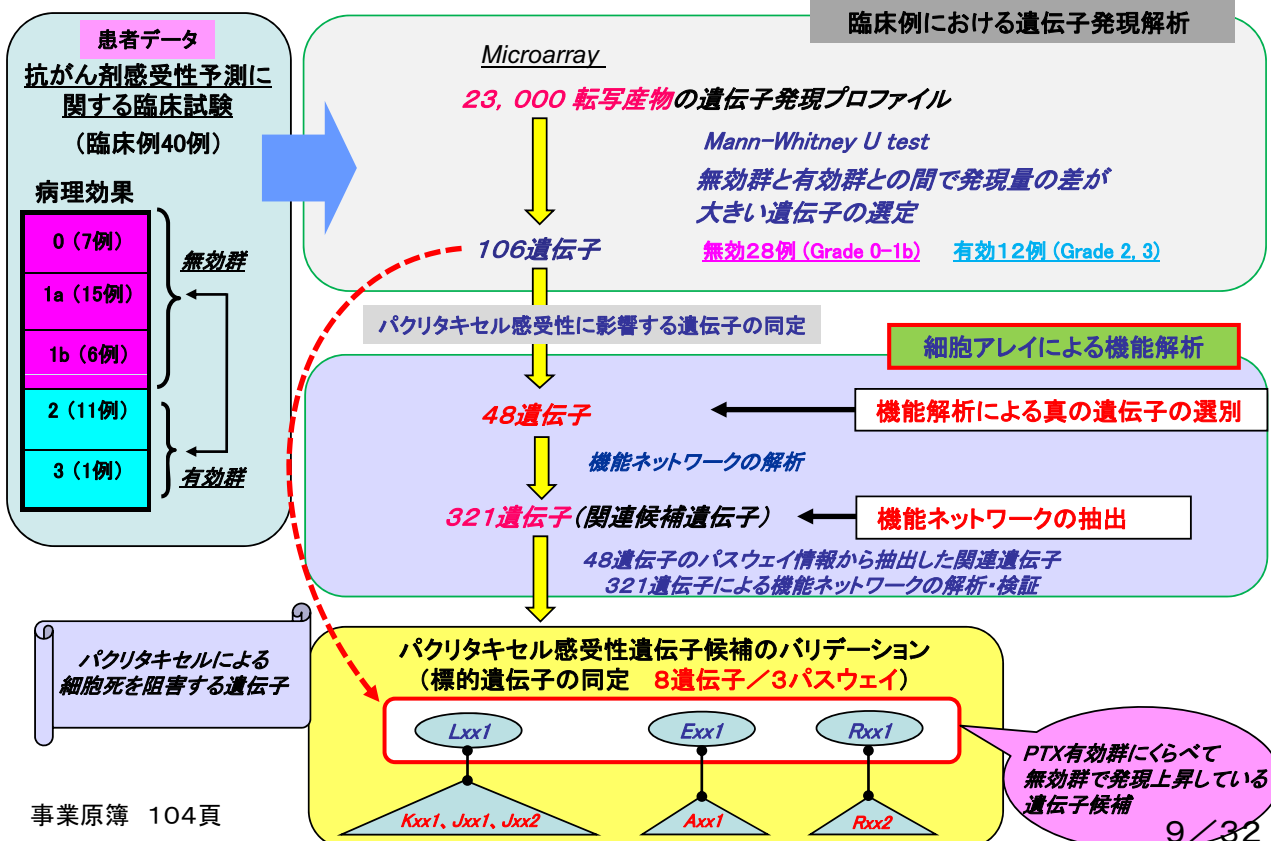
数値化

機能解析による真の遺伝子の選別

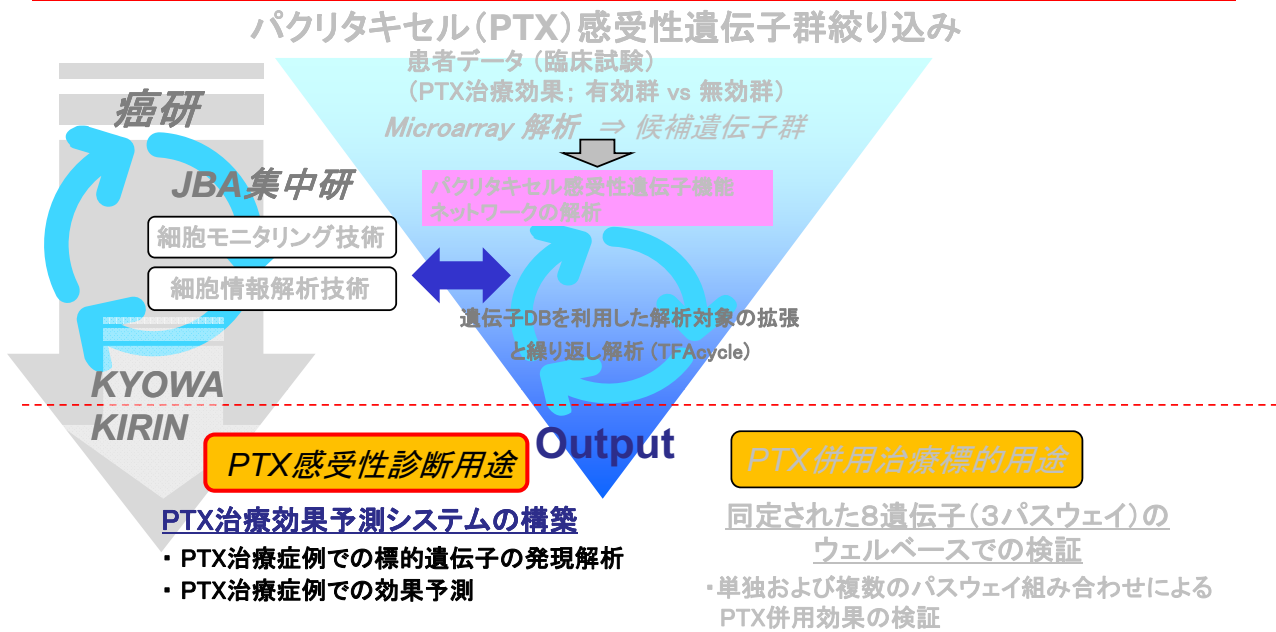
一癌研究会・協和発酵キリン

パクリタキセル感受性候補遺伝子の同定

公開



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

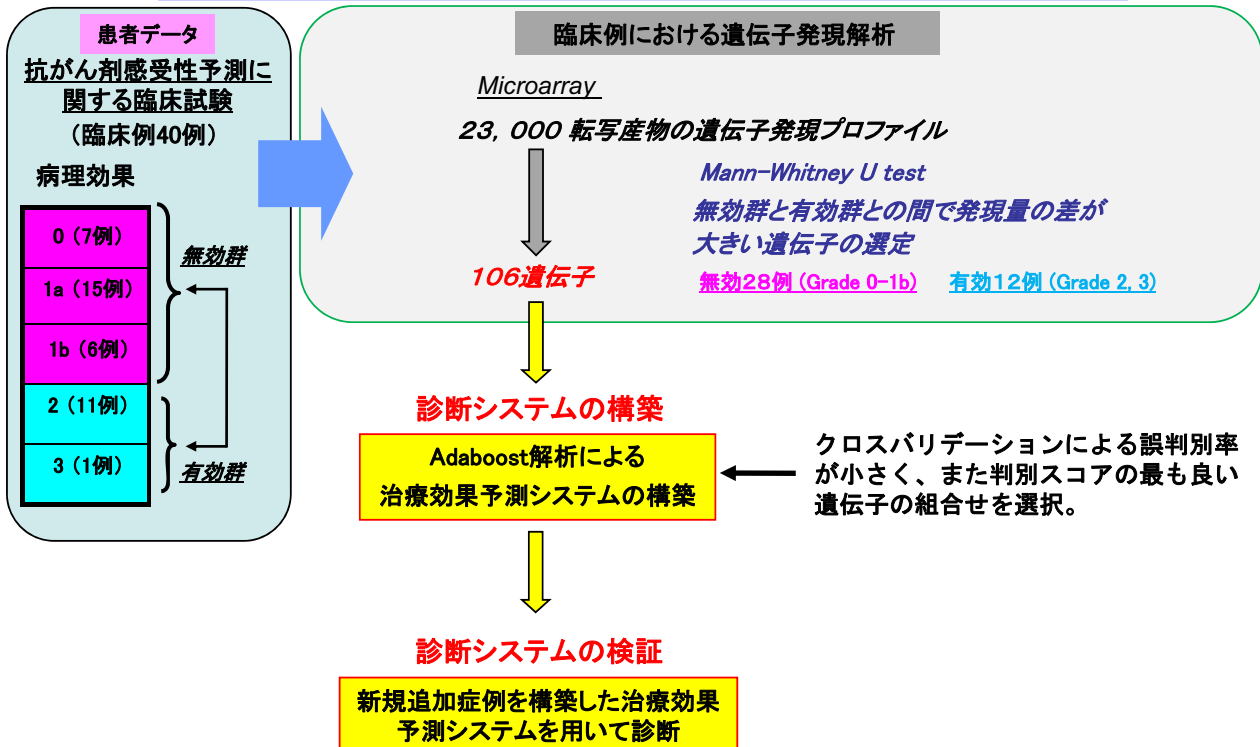


期待される効果

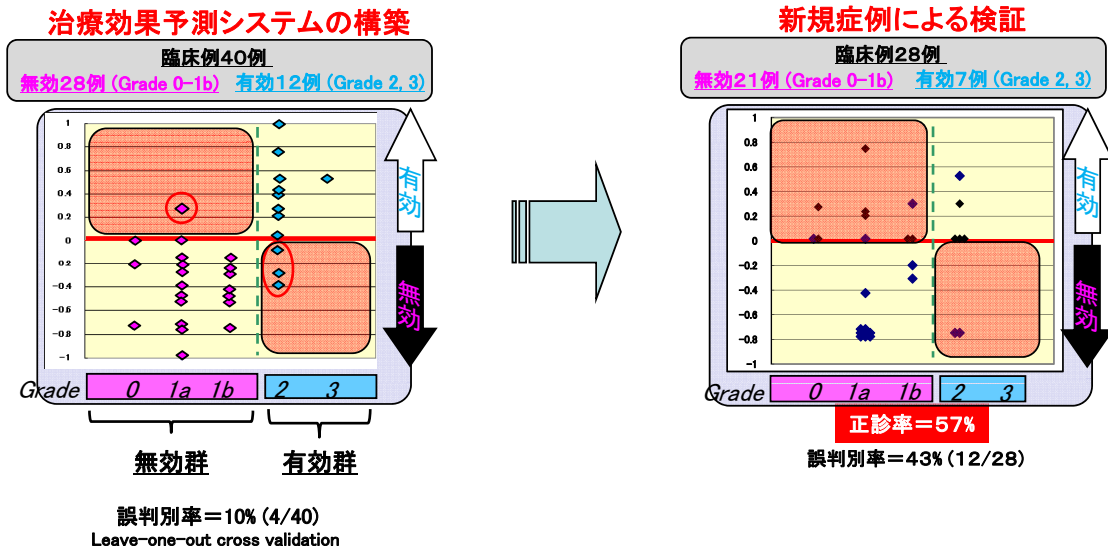
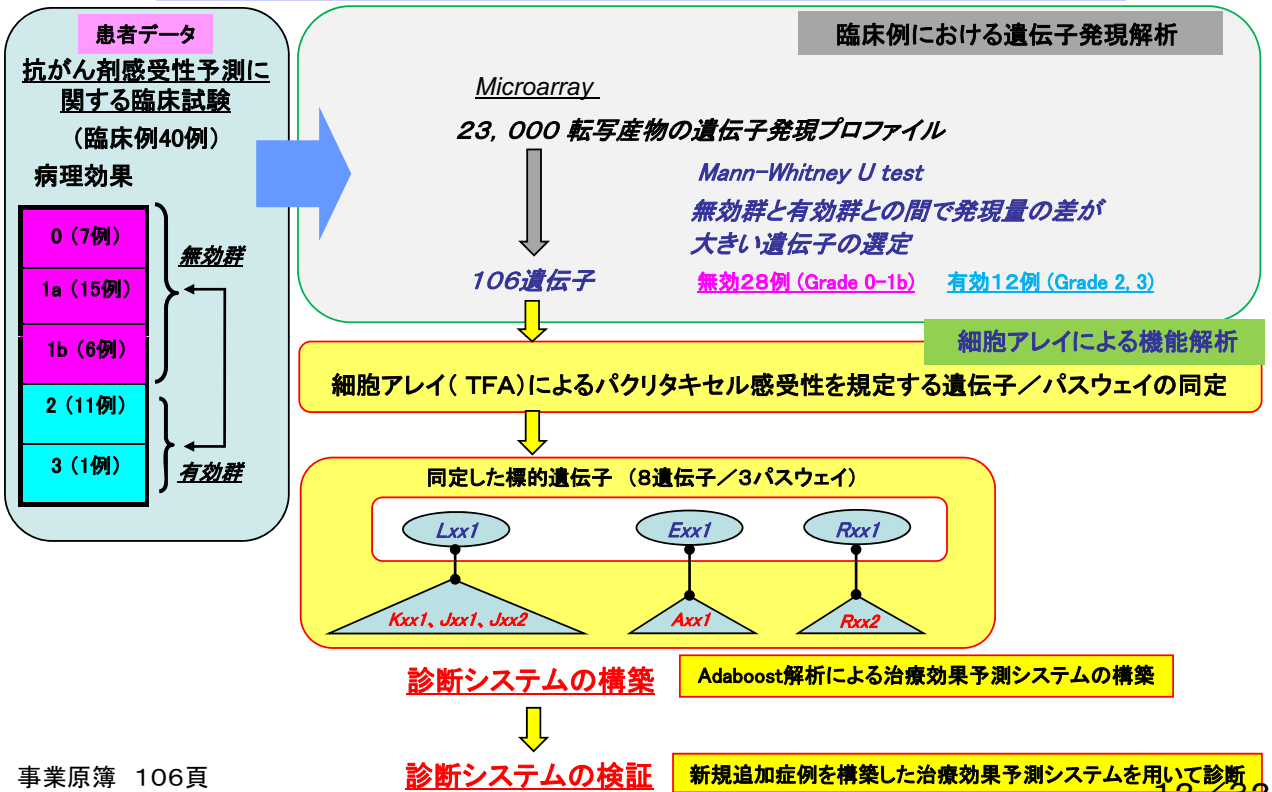
- より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立することで、患者に合わせた最も有効な抗癌剤の選択を可能にするだけでなく、同種の機序を有する新薬の臨床開発においては、効果が期待される患者の選択を通して、より効率的な臨床試験を想定することが可能。
- 抗癌剤の薬効発現機序に関わる遺伝子およびネットワークは、新たな抗癌剤標的につながる。

パクリタキセル感受性診断の構築と検証(1)

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



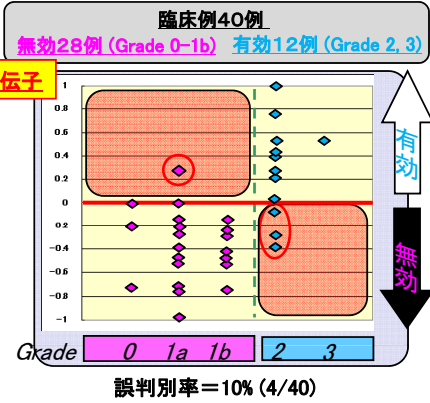
遺伝子発現解析から選定された106遺伝子をもとに Adaboost解析による治療効果予測システムの構築

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%

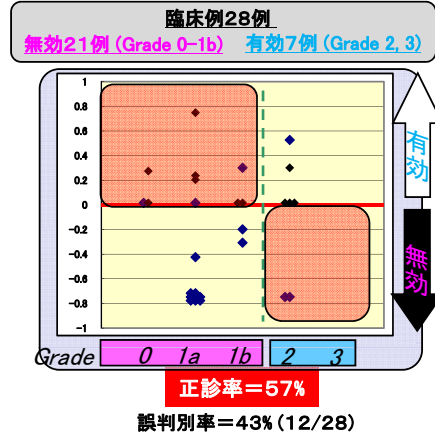
パクリタキセル感受性診断の構築と検証

公開

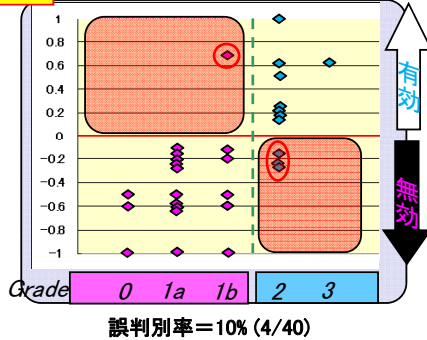
治療効果予測システムの構築



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



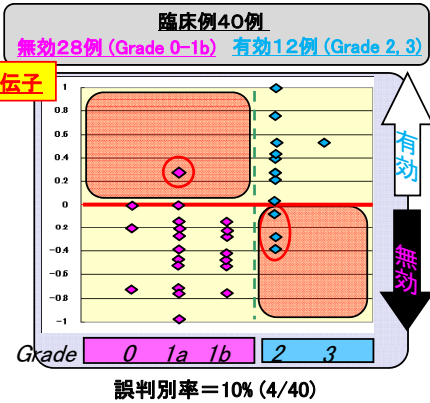
細胞アレイ(TFA)による遺伝子機能解析で同定した8遺伝子をもとにAdaboost解析による治療効果予測システムの構築

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%

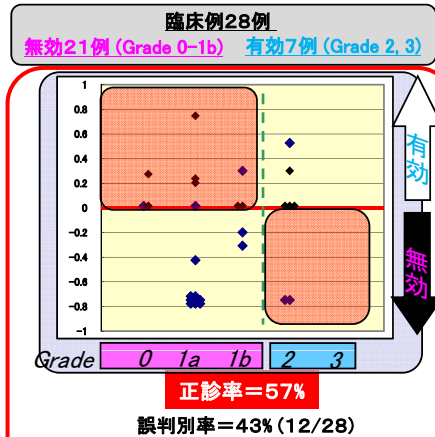
パクリタキセル感受性診断の構築と検証

公開

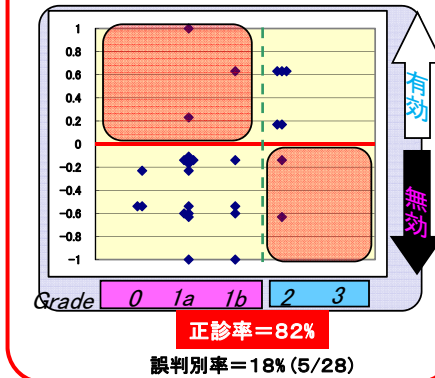
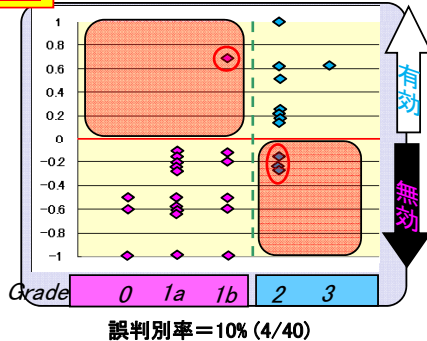
治療効果予測システムの構築



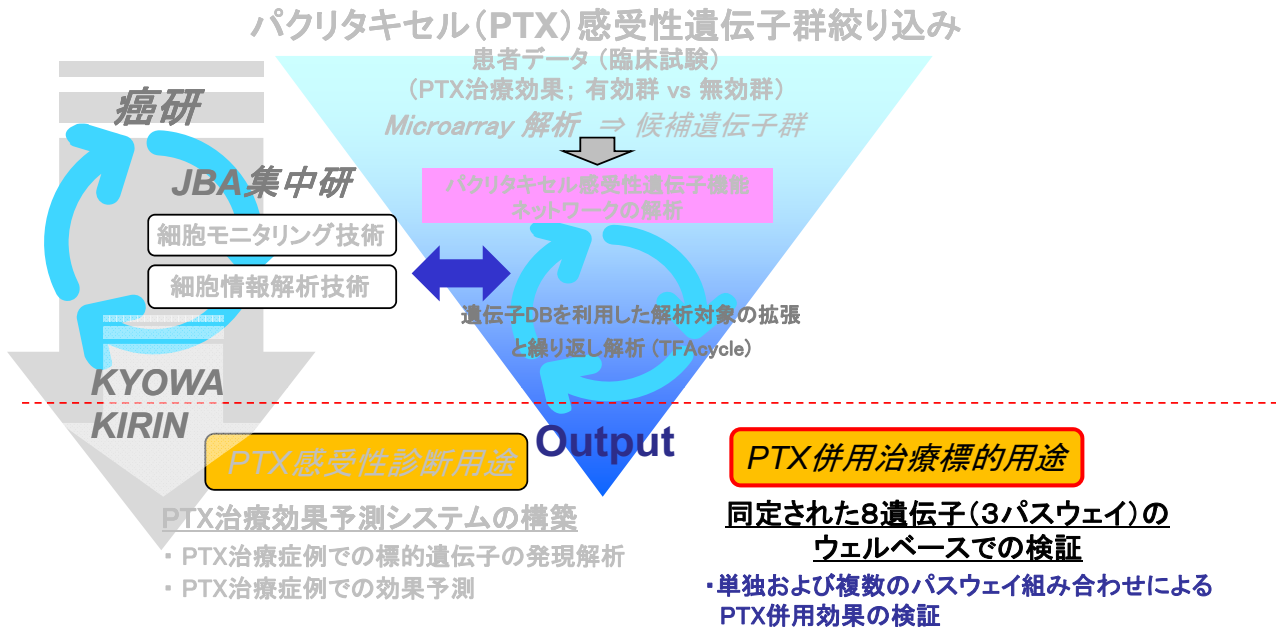
新規症例による検証



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

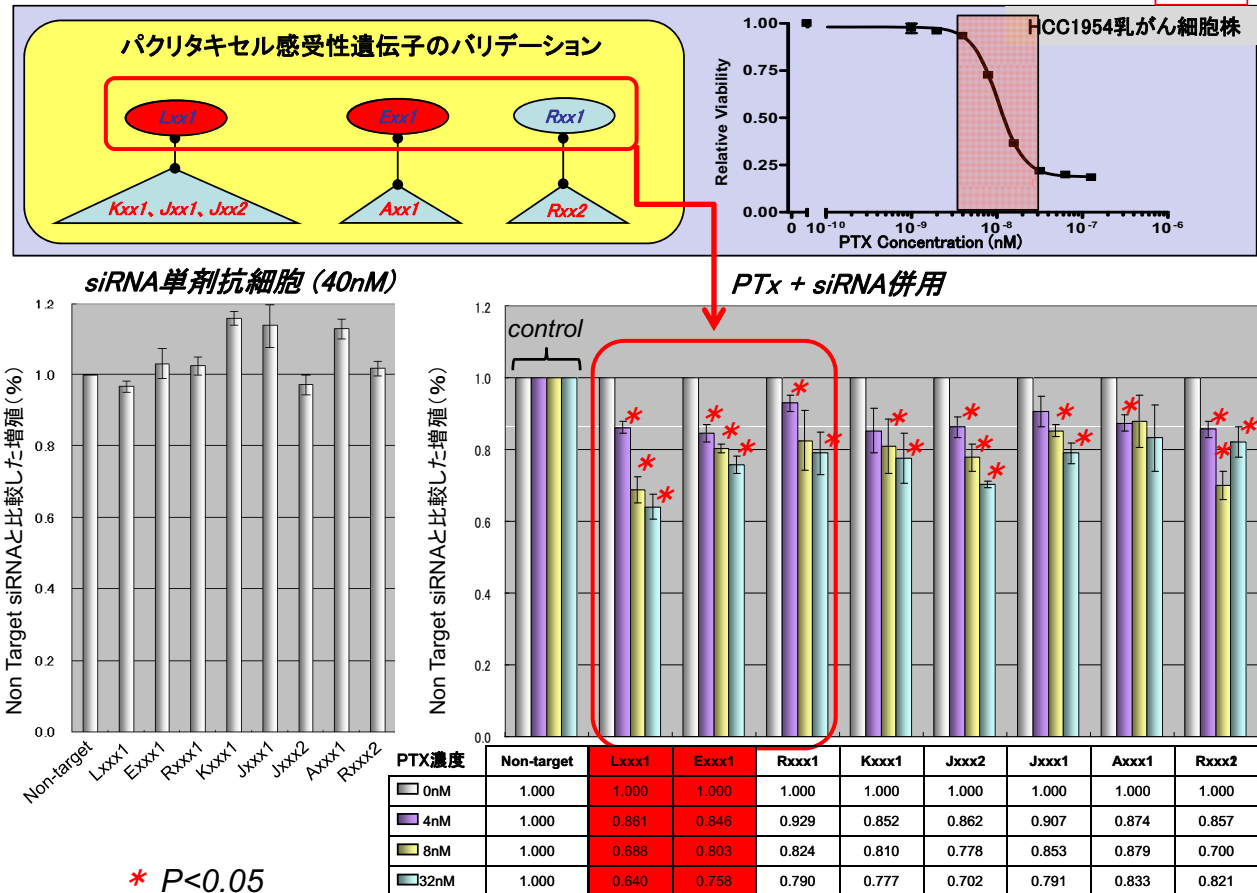


パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索



期待される効果

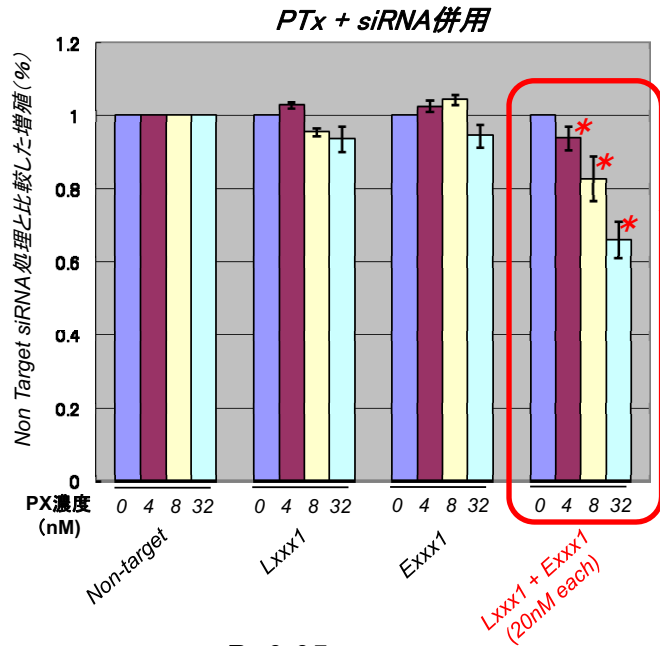
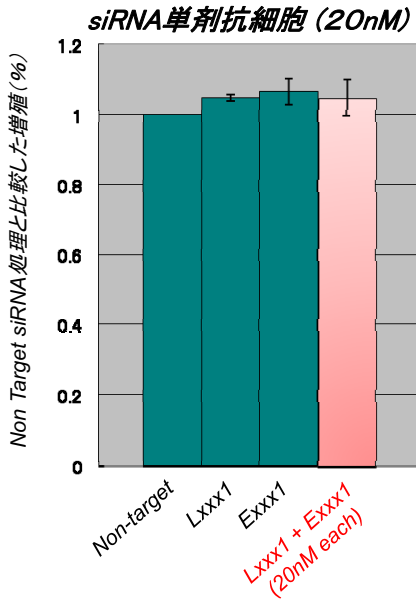
- より精度の高い次世代の治療効果予測システムの確立することで、患者に合わせた最も有効な抗癌剤の選択を可能にするだけでなく、同種の機序を有する新薬の臨床開発においては、効果が期待される患者の選択を通して、より効率的な臨床試験を想定することが可能。
- 抗癌剤の薬効発現機序に関わる遺伝子およびネットワークは、新たな抗癌剤標的につながる。



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

公開

— HCC1954乳がん細胞株—



事業原簿 108頁

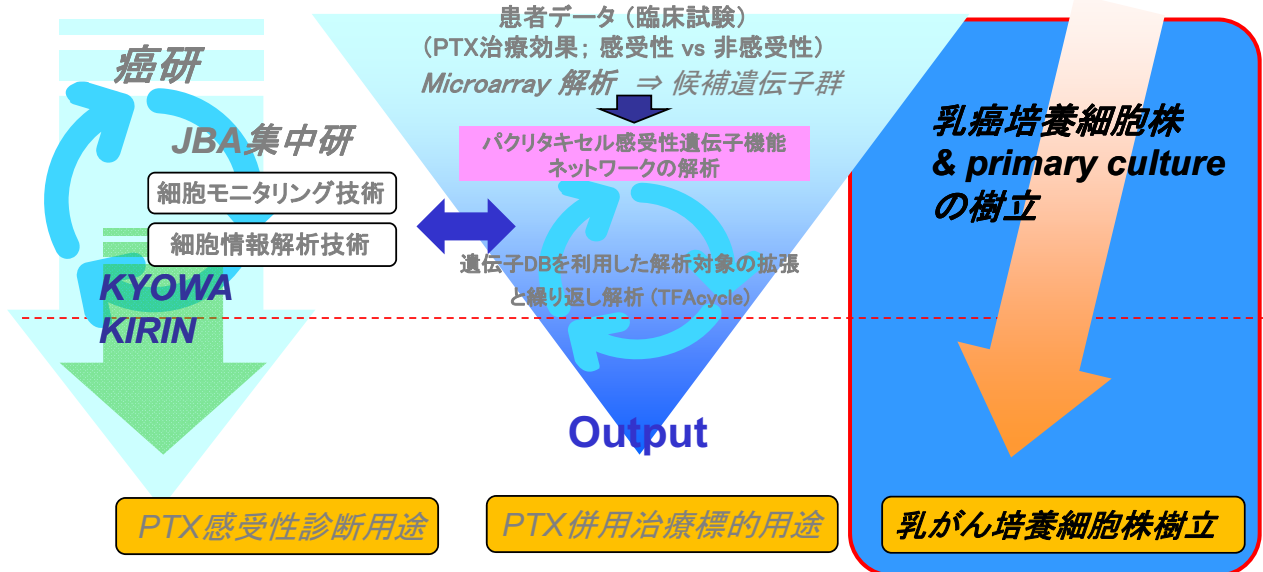
* P<0.05

18 / 32

公開

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



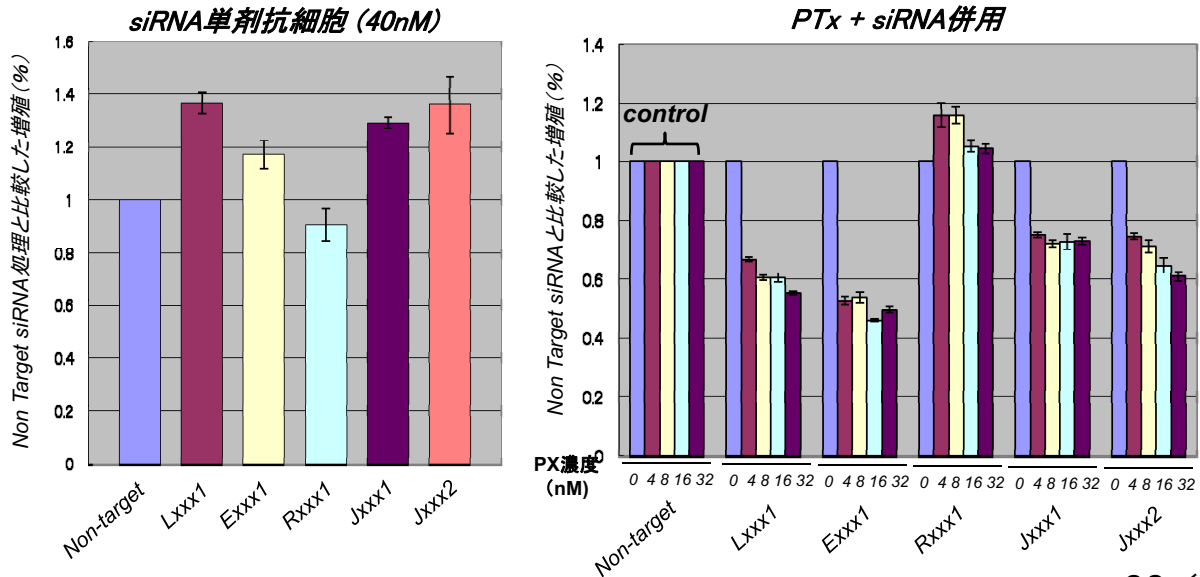
- 針生検検体 10~20の初代培養細胞株が常時培養
- 手術摘出検体 9株の培養細胞株樹立
・乳腺葉状腫瘍 2株、Triple-negative 1株を含む

19 / 32

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)—



20/32

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。

21/32

パスイエイ解析を利用した 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～

事業原簿 98頁

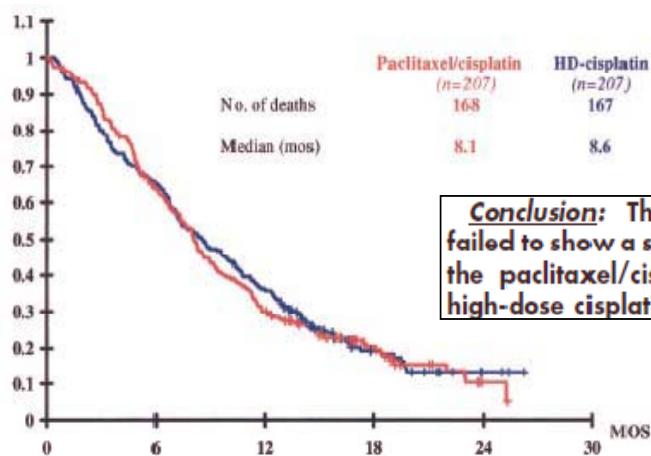
22 / 32

—癌研究会・協和発酵キリン—

20世紀の抗がん剤併用療法開発の一例

公開

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.

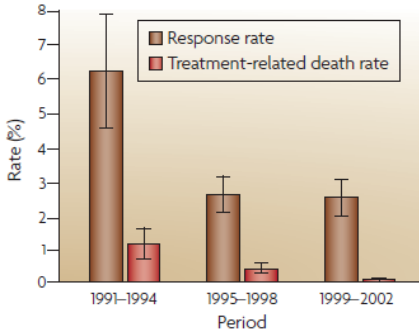
Fig 1. Survival.

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？

23 / 32

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



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

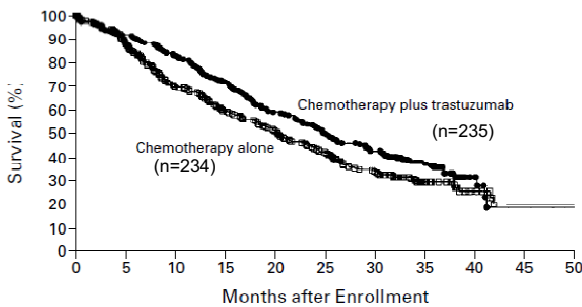
	標準治療として用いられている化学療法	併用される分子標的薬
大腸癌	5FU Capecitabine Oxaliplatin	代謝拮抗 代謝拮抗 白金製剤
乳癌	Docetaxel, Paclitaxel Doxorubicin, Epirubicin Cyclophosphamide Fluorouracil Gemcitabine Capecitabine Vinorelbine	微小管作用 DNA作用 DNA作用 代謝拮抗 代謝拮抗 代謝拮抗 微小管作用
非小細胞肺癌	Cisplatin, Carboplatin Vinorelbine Etoposide Docetaxel, Paclitaxel Gemcitabine Vinblastine Pemetrexed Irinotecan Ifosfamide Mitomycin	白金製剤 微小管作用 トポイソメラーゼ 微小管作用 代謝拮抗 微小管作用 代謝拮抗 トポイソメラーゼ DNA作用 DNA作用
		Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Panitumumab EGFR Trastuzumab Her2 Lapatinib Her2 Bevacizumab VEGF Cetuximab EGFR Erlotinib EGFR

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

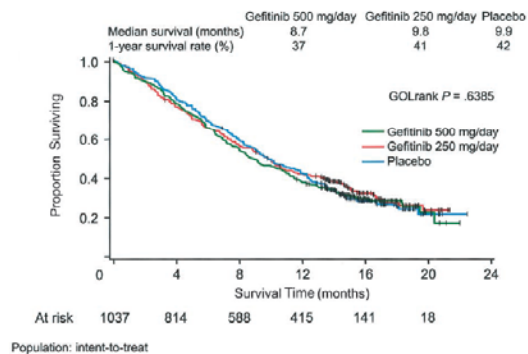
Her2抗体 (Trastuzumab)
乳癌 化学療法との併用PIII試験の事例



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 (パクリタキセル+カルボプラチン)との併用PIII試験の事例



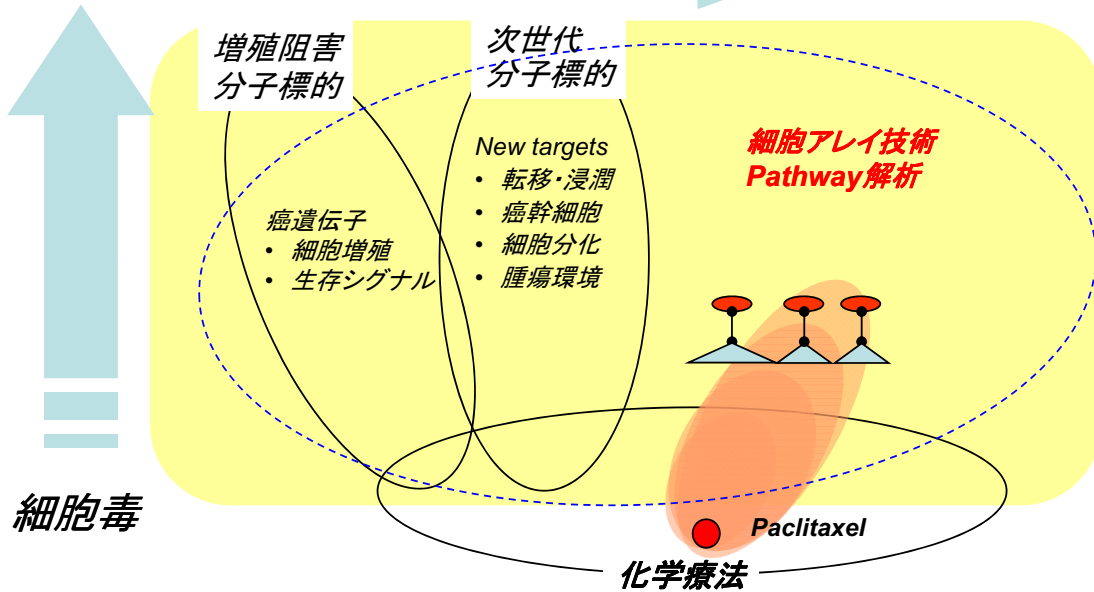
J Clin Oncol 22:785-794. © 2004 by American Society of Clinical Oncology

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

分子標的創薬



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。

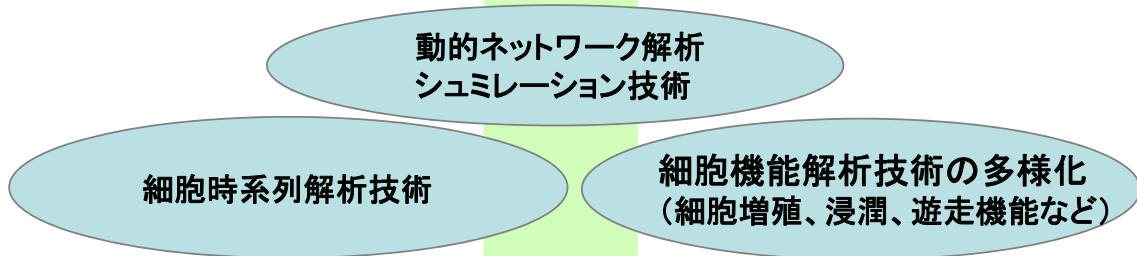
【本研究での到達点】

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



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

28 / 32

Appendices

29 / 32

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

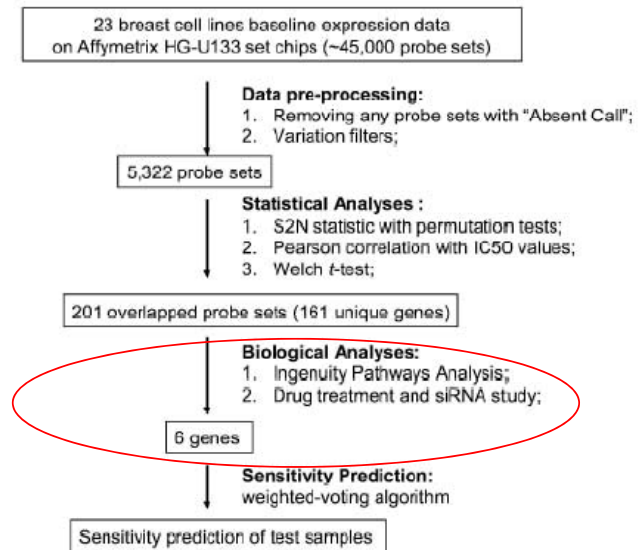
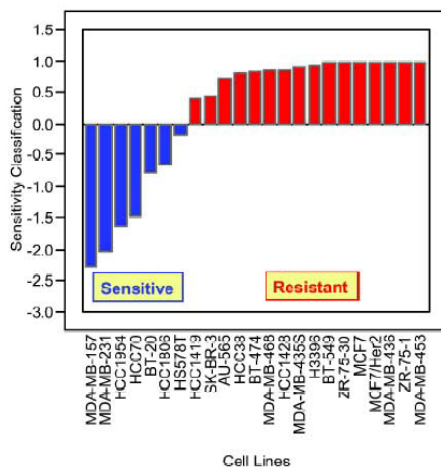
絨毯爆撃的なアプローチで網羅的に感受性・非感受性因子を探索

- ✓ 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

公開

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)

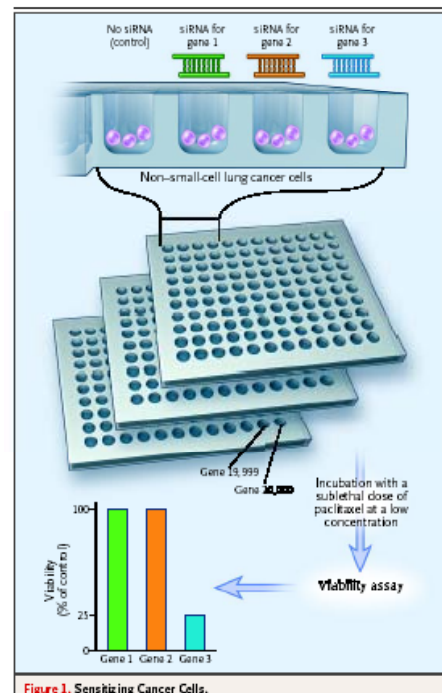


Figure 1. Sensitizing Cancer Cells.

32 / 32

公開

応用研究

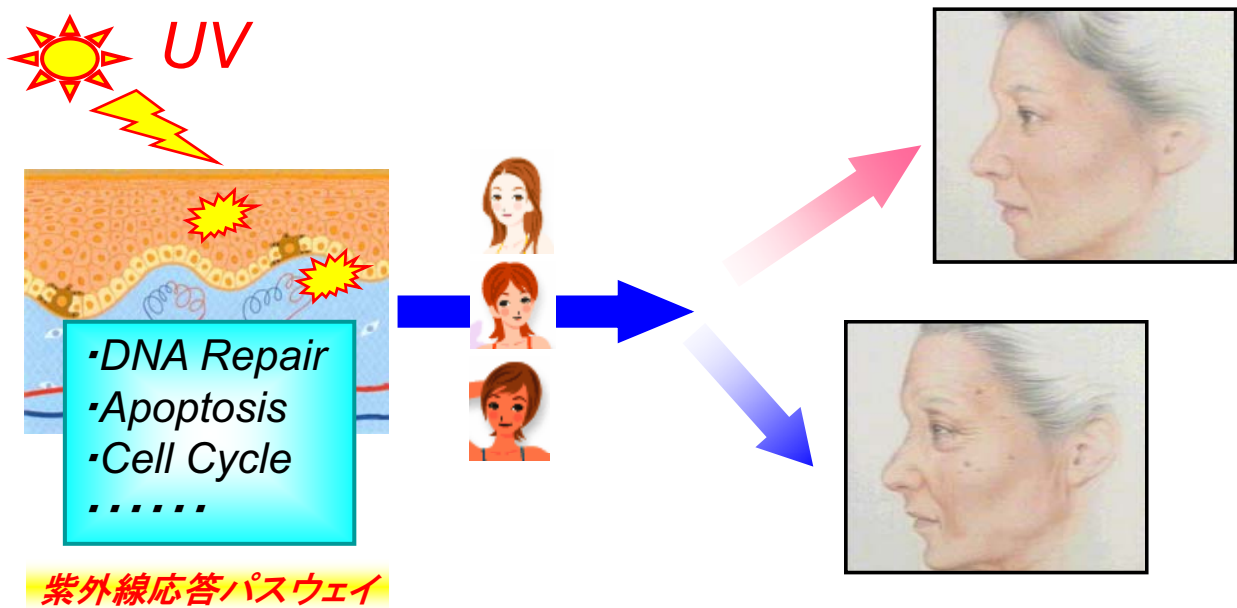
- ・ パスウェイ解析を応用したパクリタキセル感受性遺伝子の探索 (癌研究会、協和発酵キリン)
- ・ パスウェイ解析を応用した機能性化粧品 の開発 (カネボウ化粧品)

1 / 13

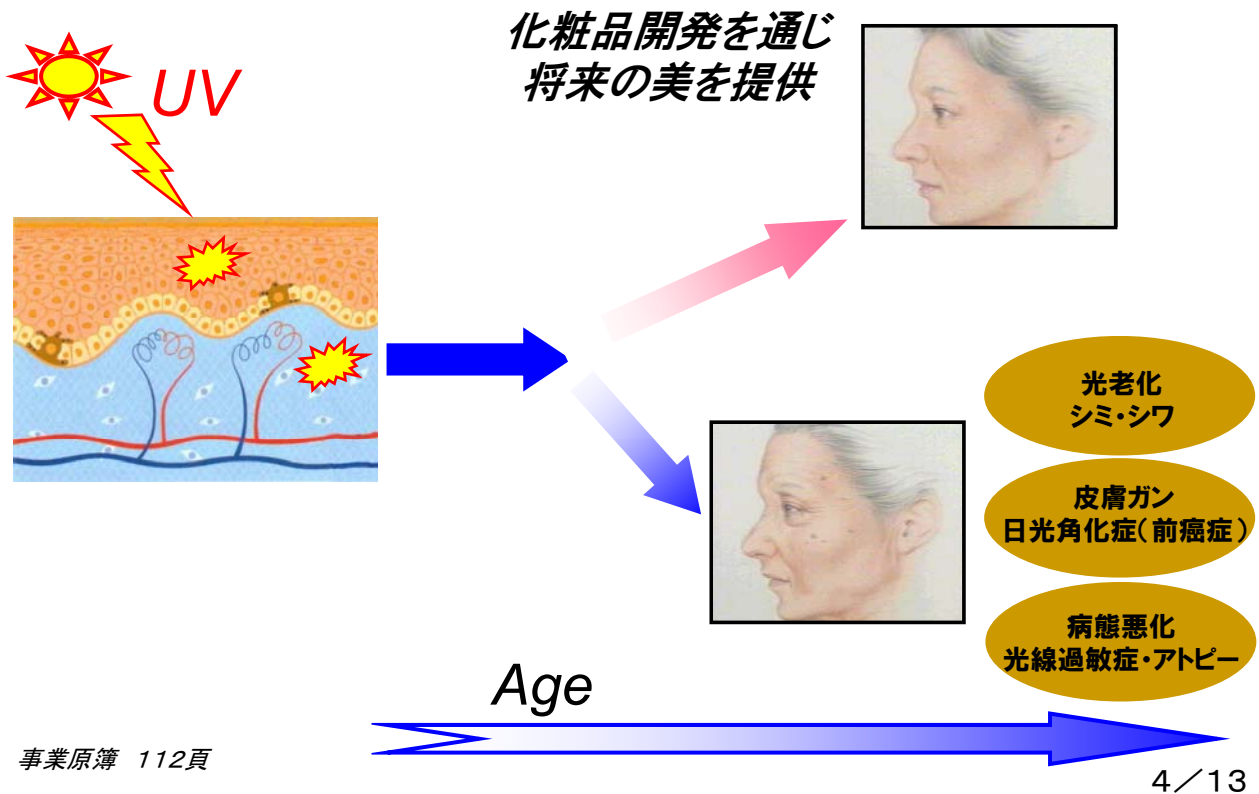
パスウェイ解析を応用した 機能性化粧品の開発

- ✓ 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

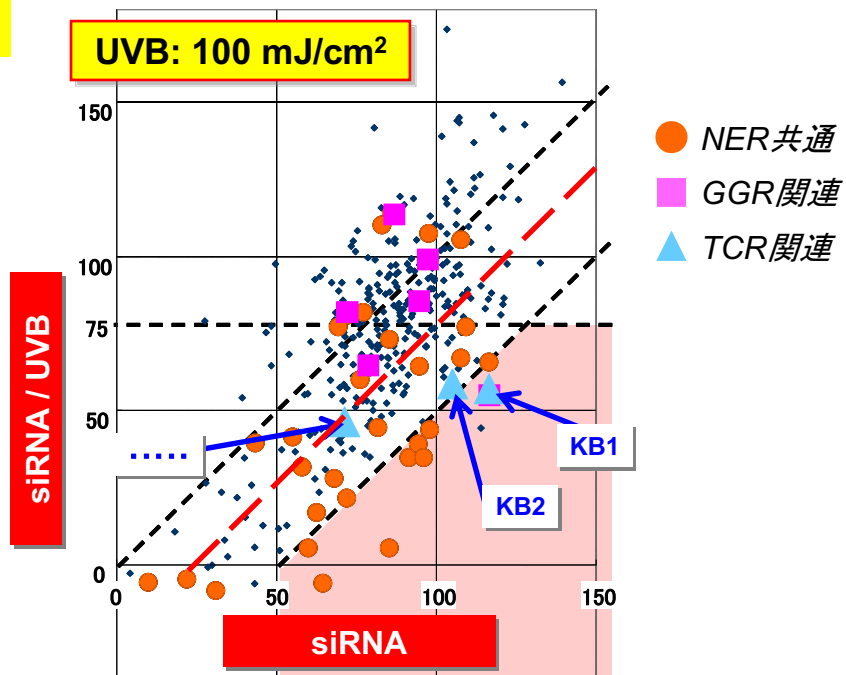


紫外線は皮膚老化を加速させる最大の環境要因



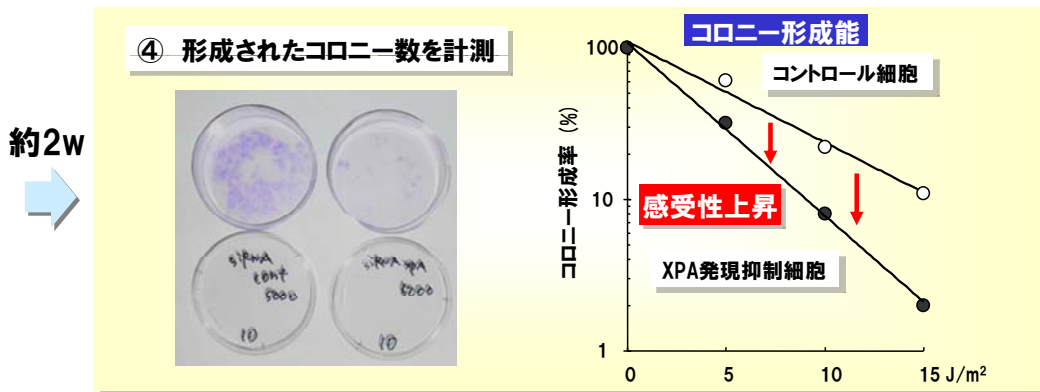
Nucleotide Excision Repair パスウェイに着目した解析

TFA解析結果



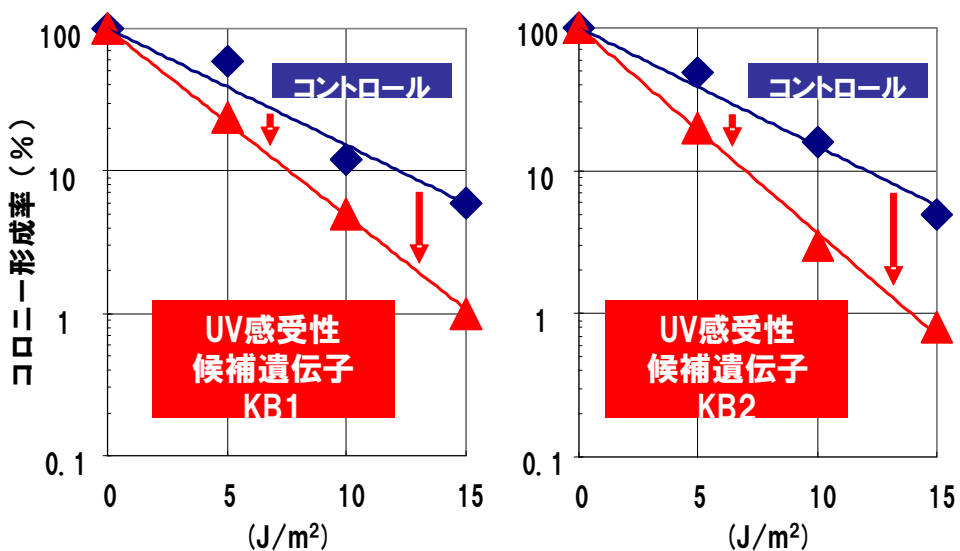
TCRに特異的な反応に関わる遺伝子の発現低下により
紫外線感受性が高まる傾向がある

紫外線感受性の検証



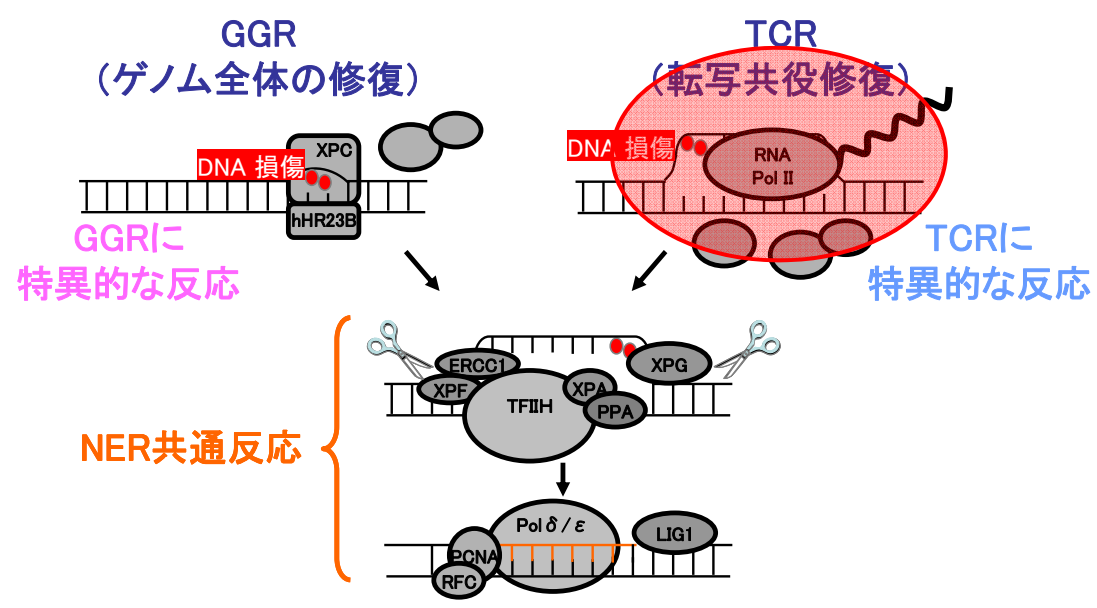
コロニー形成能を指標とした評価へ

紫外線感受性の検証



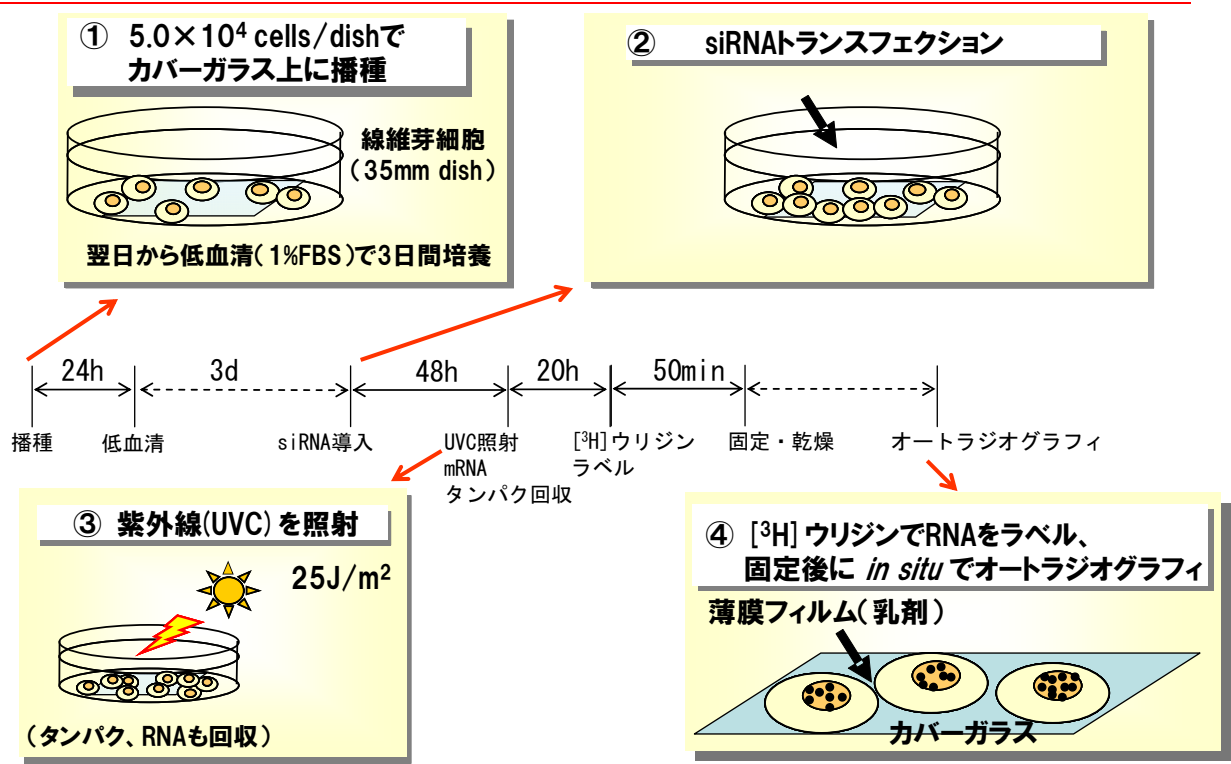
ノックダウンにより紫外線感受性が増加

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



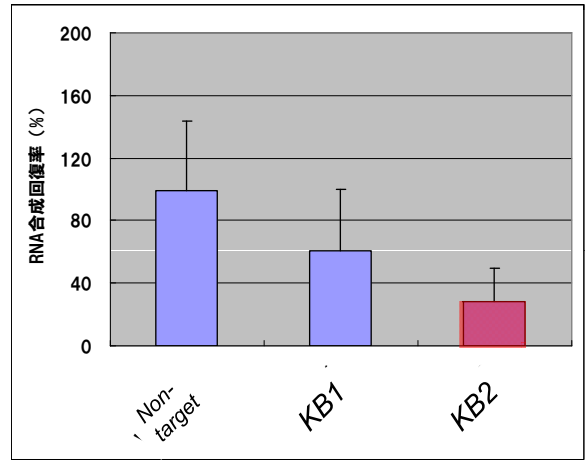
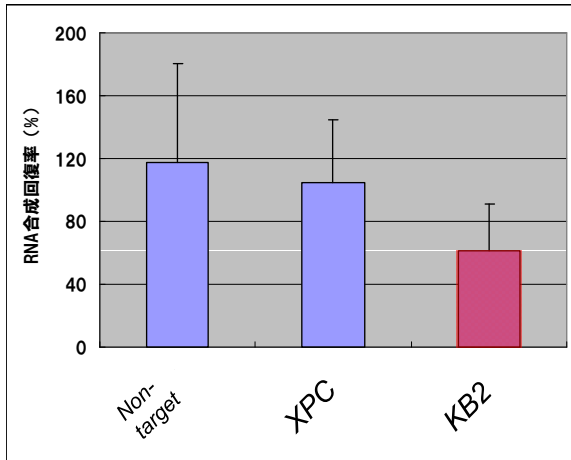
TCRに特異的なパスウェイが正常細胞の紫外線感受性を制御するターゲットでは？

TCR活性の評価へ (RNA合成回復試験)



紫外線非照射群のグレイン数を100%とした時の照射群のグレイン(黒点)数を指標とし、RNA合成能を算出

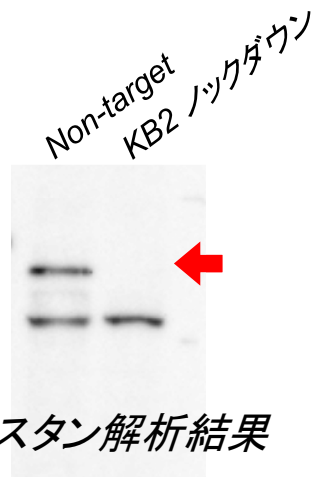
siRNA 導入／RNA合成回復試験



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

10/13

KB2 をターゲットとした素材探索評価系の構築



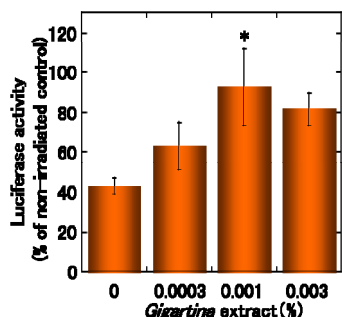
短期的開発視点では植物エキスより、
中・長期的開発視点では化合物よりスクリーニングを開始する

KB2 を過剰発現させたときの紫外線抵抗性を検証

11/13

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。

12 / 13

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。

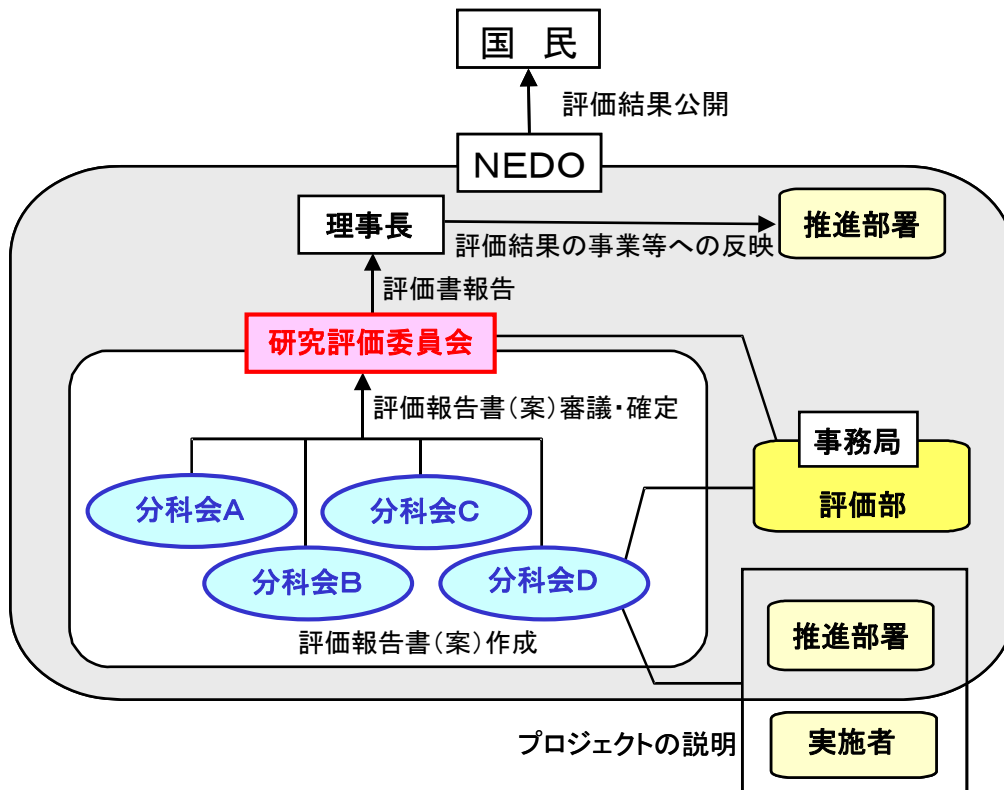
13 / 13

参考資料 1 評価の実施方法

本評価は、「技術評価実施規程」（平成 15 年 10 月制定）に基づいて研究評価を実施する。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）における研究評価の手順は、以下のように被評価プロジェクトごとに分科会を設置し、同分科会にて研究評価を行い、評価報告書（案）を策定の上、研究評価委員会において確定している。

- 「NEDO 技術委員・技術委員会等規程」に基づき研究評価委員会を設置
- 研究評価委員会はその下に分科会を設置



1. 評価の目的

評価の目的は「技術評価実施規程」において。

- 業務の高度化等の自己改革を促進する
- 社会に対する説明責任を履行するとともに、
経済・社会ニーズを取り込む
- 評価結果を資源配分に反映させ、資源の重点化及び業務の効率化を
促進する

としている。

本評価においては、この趣旨を踏まえ、本事業の意義、研究開発目標・計画の妥当性、計画を比較した達成度、成果の意義、成果の実用化の可能性等について検討・評価した。

2. 評価者

技術評価実施規程に基づき、事業の目的や態様に即した外部の専門家、有識者からなる委員会方式により評価を行う。分科会委員選定に当たっては以下の事項に配慮して行う。

- 科学技術全般に知見のある専門家、有識者
- 当該研究開発の分野の知見を有する専門家
- 研究開発マネジメントの専門家、経済学、環境問題、国際標準、その他社会的ニーズ関連の専門家、有識者
- 産業界の専門家、有識者
- ジャーナリスト

また、評価に対する中立性確保の観点から事業の推進側関係者を選任対象から除外し、また、事前評価の妥当性を判断するとの側面にかんがみ、事前評価に関与していない者を主体とする。

これらに基づき、分科会委員名簿にある7名を選任した。

なお、本分科会の事務局については、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構評価部が担当した。

3. 評価対象

平成17年度に開始された「細胞アレイ等による遺伝子機能の解析技術開発」プロジェクトを評価対象とした。

なお、分科会においては、当該事業の推進部署から提出された事業原簿、プ

プロジェクトの内容、成果に関する資料をもって評価した。

4. 評価方法

分科会においては、当該事業の推進部署及び研究実施者からのヒアリングと、それを踏まえた分科会委員による評価コメント作成、評点法による評価及び実施者側等との議論等により評価作業を進めた。

なお、評価の透明性確保の観点から、知的財産保護の上で支障が生じると認められる場合等を除き、原則として分科会は公開とし、研究実施者と意見を交換する形で審議を行うこととした。

5. 評価項目・評価基準

分科会においては、次に掲げる「評価項目・評価基準」で評価を行った。これは、研究評価委員会による『各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格、中間・事後評価の別等に応じて、各分科会において判断すべき者である。』との考え方に従い、第1回分科会において、事務局が、研究評価委員会により示された「標準的評価項目・評価基準」(参考資料 1-7 頁参照)をもとに改定案を提示し、承認されたものである。

プロジェクト全体に係わる評価においては、主に事業の目的、計画、運営、達成度、成果の意義や実用化への見通し等について評価した。各個別テーマに係る評価については、主にその目標に対する達成度等について評価した。

評価項目・評価基準

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 国民が健康で安心して暮らせる社会の実現をめざ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目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであることにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、市場動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。

- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
 - ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携が十分に行われる体制となっているか。
 - ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。
- (4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性
- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
 - ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。
- (5) 情勢変化への対応等
- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
 - ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3) 知的財産権等の取得の取組及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。

(4) 成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1) 成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。

(2) 波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

標準的評価項目・評価基準（事後評価）

2010. 3. 26

【事後評価 標準的評価項目・評価基準の位置付け（基本的考え方）】

標準的評価項目・評価基準は、第25回研究評価委員会（平成22年3月26日付）において以下のとおり定められている。（本文中の記載例による1・・・、2・・・、3・・・、4・・・が標準的評価項目、それぞれの項目中の(1)・・・、(2)・・・が標準的評価基準、それぞれの基準中の・・・が視点）

ただし、これらの標準的評価項目・評価基準は、研究開発プロジェクトの事後評価における標準的な評価の視点であり、各分科会における評価項目・評価基準は、被評価プロジェクトの性格等に応じて、各分科会において判断すべきものである。

1. 事業の位置付け・必要性について

(1) NEDOの事業としての妥当性

- ・ 特定の施策（プログラム）、制度の下で実施する事業の場合、当該施策・制度の目標達成のために寄与しているか。
- ・ 民間活動のみでは改善できないものであること、又は公共性が高いことにより、NEDOの関与が必要とされる事業か。
- ・ 当該事業を実施することによりもたらされる効果が、投じた予算との比較において十分であるか。

(2) 事業目的の妥当性

- ・ 内外の技術開発動向、国際競争力の状況、エネルギー需給動向、市場動向、政策動向、国際貢献の可能性等から見て、事業の目的は妥当か。

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・ 研究管理法をを経由する場合、研究管理法が真に必要な役割を担っているか。
- ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化、事業化に向けたマネジメントの妥当性

- ・ 成果の実用化、事業化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・ 成果の実用化、事業化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。(※)

(※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」)

- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることを期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化、事業化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 産業技術としての見極め（適用可能性の明確化）ができているか。
- ・ 実用化に向けて課題が明確になっているか。課題解決の方針が明確になっているか。

- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2) 事業化までのシナリオ

- ・ NEDO後継プロジェクト、NEDO実用化助成、企業内研究等、プロジェクト終了後の事業化までの道筋は明確か。
- ・ 市場の規模や成長性、コストダウン、競合技術との比較、導入普及、事業化までの期間、事業化とそれに伴う経済効果等の見通しは立っているか。

(3) 波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

※基礎的・基盤的研究及び知的基盤・標準整備等の研究開発の場合は、以下の項目・基準による。

*基礎的・基盤的研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1)研究開発目標の妥当性

- ・内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2)研究開発計画の妥当性

- ・目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3)研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。
- ・研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
- ・実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

- ・成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
- ・成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。

(5)情勢変化への対応等

- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
- ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1)目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。（※）
（※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。」）
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2)成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながる事が期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は、他の競合技術と比較して優位性があるか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1) 成果の実用化可能性

- ・ 実用化イメージ・出口イメージが明確になっているか。
- ・ 実用化イメージ・出口イメージに基づき、開発の各段階でマイルストーンを明確にしているか。それを踏まえ、引き続き研究開発が行われる見通しは立っているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。

(2) 波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合

2. 研究開発マネジメントについて

(1) 研究開発目標の妥当性

- ・ 内外の技術動向、市場動向等を踏まえて、戦略的な目標が設定されているか。
- ・ 具体的かつ明確な開発目標を可能な限り定量的に設定しているか。
- ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

(2) 研究開発計画の妥当性

- ・ 目標達成のために妥当なスケジュール、予算（各個別研究テーマ毎の配分を含む）となっているか。
- ・ 目標達成に必要な要素技術を取り上げているか。
- ・ 研究開発フローにおける要素技術間の関係、順序は適切か。
- ・ 継続プロジェクトや長期プロジェクトの場合、技術蓄積を、実用化の観点から絞り込んだうえで活用が図られているか。

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

- ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか。
- ・ 真に技術力と事業化能力を有する企業を実施者として選定しているか。

- ・ 研究管理法人を経由する場合、研究管理法人が真に必要な役割を担っているか。
 - ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか。
 - ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な実施者間の連携 and/or 競争が十分に行われる体制となっているか。
 - ・ 実用化シナリオに基づき、成果の受け取り手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、関与を求める体制を整えているか。
- (4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性
- ・ 成果の実用化につなげる戦略が明確になっているか。
 - ・ 成果の実用化につなげる知財マネジメントの方針が明確に示され、かつ妥当なものか。
- (5) 情勢変化への対応等
- ・ 進捗状況を常に把握し、社会・経済の情勢の変化及び政策・技術動向に機敏かつ適切に対応しているか。
 - ・ 計画見直しの方針は一貫しているか（中途半端な計画見直しが研究方針の揺らぎとなっていないか）。計画見直しを適切に実施しているか。

3. 研究開発成果について

(1) 目標の達成度

- ・ 成果は目標値をクリアしているか。(※)
- (※事後評価前倒し実施の場合は、「成果は目標値をクリアする見込みか。）」
- ・ 全体としての目標達成はどの程度か。
- ・ 目標未達成の場合、目標達成までの課題を把握し、課題解決の方針が明確になっているか。

(2) 成果の意義

- ・ 成果は市場の拡大或いは市場の創造につながることが期待できるか。
- ・ 成果は、世界初あるいは世界最高水準か。
- ・ 成果は、新たな技術領域を開拓することが期待できるか。
- ・ 成果は汎用性があるか。
- ・ 投入された予算に見合った成果が得られているか。
- ・ 成果は公開性が確保されているか。

(3)知的財産権等の取得及び標準化の取組

- ・ 研究内容に新規性がある場合、知的財産権等の取扱（特許や意匠登録出願、著作権や回路配置利用権の登録、品種登録出願、営業機密の管理等）は事業戦略、または実用化計画に沿って国内外に適切に行われているか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、得られた研究開発の成果に基づく国際標準化に向けた提案等の取組が適切に行われているか。

(4)成果の普及

- ・ 論文の発表は、研究内容を踏まえ適切に行われているか。
- ・ 成果の受取手（ユーザー、活用・実用化の想定者等）に対して、適切に成果を普及しているか。また、普及の見通しは立っているか。
- ・ 一般に向けて広く情報発信をしているか。

4. 実用化の見通しについて

(1)成果の実用化可能性

- ・ 整備した知的基盤についての利用は実際にあるか、その見通しが得られているか。
- ・ 公共財として知的基盤を供給、維持するための体制は整備されているか、その見込みはあるか。
- ・ 国際標準化に関する事項が計画されている場合、国際規格化等、標準整備に向けた見通しが得られているか。
- ・ J I S化、標準整備に向けた見通しが得られているか。注）国内標準に限る
- ・ 一般向け広報は積極的になされているか。

(2)波及効果

- ・ 成果は関連分野への波及効果（技術的・経済的・社会的）を期待できるものか。
- ・ プロジェクトの実施自体が当該分野の研究開発や人材育成等を促進するなどの波及効果を生じているか。

参考資料 2 評価に係る被評価者意見

研究評価委員会（分科会）は、評価結果を確定するにあたり、あらかじめ当該実施者に対して評価結果を示し、その内容が、事実関係から正確性を欠くなどの意見がある場合に、補足説明、反論などの意見を求めた。研究評価委員会（分科会）では、意見があったものに対し、必要に応じて評価結果を修正の上、最終的な評価結果を確定した。

評価結果に対する被評価者意見は全て反映された。

本研究評価委員会報告は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）評価部が委員会の事務局として編集しています。

平成22年11月

NEDO 評価部

部長 竹下 満

主幹 寺門 守

担当 橋山 富樹

* 研究評価委員会に関する情報は NEDO のホームページに掲載しています。

(<http://www.nedo.go.jp/iinkai/kenkyuu/index.html>)

〒212-8554 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番地

ミュージア川崎セントラルタワー20F

TEL 044-520-5161 FAX 044-520-5162