

「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した 創薬基盤技術開発」

事業原簿（公開）

担当部	国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 ロボット・機械システム部
-----	---

目次

概要	2
プロジェクト用語集	6
I. 事業の位置付け・必要性について	8
1. NEDO の関与の必要性・制度への適合性	8
1.1. NEDO が関与することの意義	8
1.2. 実施の効果（費用対効果）	8
2. 事業の背景・目的・位置付け	8
II. 研究開発マネジメントについて	10
1. 事業の目標	10
2. 事業の計画内容	11
2.1. 研究開発の内容	11
2.2. 研究開発の実施体制	19
2.3. 研究開発の運営管理	20
2.4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性	21
3. 情勢変化への対応	21
4. 中間評価結果への対応	21
5. 評価に関する事項	22
III. 研究開発成果について	23
1. 事業全体の成果	23
2. 研究開発項目毎の成果	27
2.1. 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」	27
2.2. 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」	55
2.3. 研究開発項目③「探索的実証研究」	85
2.4. 研究開発項目④「総合調査研究」	104
IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	107
1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて	107
添付資料	108
健康安心イノベーションプログラム基本計画	109
プロジェクト基本計画	122
事前評価関連資料	132
文献発表・学会発表等・特許出願	136

概要

最終更新日 平成 27 年 5 月 27 日

プログラム（又は施策）名	健康安心イノベーションプログラム					
プロジェクト名	後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発	プロジェクト番号	P10005			
担当推進部/担当者	バイオテクノロジー・医療技術部/主任研究員 菅原武雄（平成 24 年 4 月～平成 27 年 2 月） バイオテクノロジー・医療技術部/主査 宮川知也（平成 22 年 10 月～平成 24 年 3 月）					
0. 事業の概要	<p>後天的ゲノム修飾（エピゲノム修飾）の高感度かつ網羅的な解析基盤技術を確立する。さらに、この解析基盤技術を用いてがん臨床検体のエピゲノム修飾解析を行い、がんの診断マーカーおよび創薬標的を同定し、企業による実用化研究につなげる。</p> <p>具体的には、エピゲノム修飾としてメチル化 DNA、ヒドロキシメチルシトシンおよびヒストンテール修飾を解析対象とし、本事業に参画している医療機関から集めたがん臨床検体のエピゲノム修飾解析を行う。メチル化 DNA 解析からはがん診断マーカー、ヒドロキシメチルシトシンおよびヒストンテール修飾解析からは創薬標的を同定する。</p> <p>これらの研究開発は、先進的なエピゲノム修飾解析技術を有する東京大学先端科学技術研究センターを集中研とするオープンラボを中核に、医療機関および製薬・診断企業で構成される技術研究組合が参加する研究体制によって推進する。</p>					
I. 事業の位置付け・必要性について	<p>1. 事業の位置付け</p> <p>本事業では、我が国の 21 世紀医薬品産業の飛躍の上で鍵となるエピゲノム診断・創薬を世界に先駆けて推進するために、DNA、RNA、タンパク質および情報処理研究者が結集し、基礎・臨床・産業が一体となった研究体制の下に、先進的エピゲノム解析をコアとする診断・創薬イノベーション基盤を確立する。</p> <p>2. 事業の必要性</p> <p>エピゲノム修飾情報と疾患との関連は未解明の部分が多く残されており、臨床情報の付随した検体の入手も困難であるため、現時点では企業が個別に参入するにはハードルが高い。さらに、個別企業が解析拠点を立ち上げることは、専門的人材の育成およびエピゲノム修飾解析のための先進的技術導入に時間を要し、自社内で推進するには莫大な投資が必要となるためリスクが高い。企業、研究者及び臨床家の連携の下に、一体的なプラットフォームとして世界トップレベルの産学連携体制を構築し、基礎研究成果を迅速に実用化に展開することは、我が国の医療産業において急務である。</p>					
II. 研究開発マネジメントについて						
事業の目標	エピゲノム修飾解析基盤技術を確立するとともに、本研究事業の成果として 5 つ以上の診断マーカー・創薬標的を同定する。					
事業の計画内容	研究開発項目	H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	H26fy
	① 後天的ゲノム修飾解析技術開発	←				→
	② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発	←				→
	③ 探索的実証研究	←				→
	④ 総合調査研究	←				→

開発予算 (百万円)	会計・勘定		H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	H26fy	総額
	一般会計		273	265	484	387	400	1,809
	開発成果創出促進財源		0	180	324	110	0	614
	総予算額		273	445	808	497	400	2,424
	(契約種類)	(委託)	○	273	445	808	497	400
(助成) : 助成率△/□			—	—	—	—	—	—
(共同研究) : 負担率△/□			—	—	—	—	—	—
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		東京大学先端科学技術研究センター 教授 油谷 浩幸					
	サブリーダー	研究開発項目 ①	東京大学先端科学技術研究センター 助教 永江 玄太					
		研究開発項目 ②	東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授 石川 俊平					
		研究開発項目 ③	東京大学先端科学技術研究センター 特任助教 川村 猛					
委託先		<p>○エピゲノム技術研究組合（4社、3機関） （株）未来創薬研究所、協和発酵キリン（株）、興和（株）、シスメックス（株）、（一社）バイオ産業情報化コンソーシアム、（独）産業技術総合研究所、（公財）がん研究会 ※共同実施先（1機関、2大学） （独）理化学研究所、（大）東京工業大学、（大）北海道大学</p> <p>○（大）東京大学 先端科学技術研究センター、医学部附属病院、大学院医学系研究科、分子細胞生物学研究所 ※共同実施先（2大学） （大）東京医科歯科大学、（学）日本大学</p>						
情勢変化への対応	<p>平成23年8月に開発成果創出促進財源として180百万円を配賦し、最新式の次世代シーケンサー、サンプル前処理装置およびデータサーバーを導入した。その結果、エピゲノム修飾解析が大幅に効率化され、蓄積された膨大なエピゲノム解析データの高速処理も可能になり、新規創薬標的分子の探索と同定が加速された。</p> <p>平成24年12月に開発成果創出促進財源として324百万円を配賦し、MALDI-TOF型質量分析計および単細胞セルソーターを導入した。その結果、臨床検体からのがん幹細胞（がん発症・進展の根源となる細胞）の選別を効率的に行うことができるようになり、予後と明確な相関を示す肺がん特異的エピゲノム修飾因子を同定することに成功した。さらに、化合物スクリーニング効率が大幅に向上した結果、上記の肺がん特異的エピゲノム修飾因子の阻害物質を取得することに成功し、この化合物を用いることにより、同定した肺がん特異的エピゲノム修飾因子の抗がん薬の標的としての妥当性が検証された。さらに、新規の抹消血液中がん診断マーカーを複数個同定することにも成功した。</p> <p>平成25年11月に開発成果創出促進財源として110百万円を配賦し、Orbitrap Fusion質量分析計を導入した。本事業でのヒストン修飾解析においては、H3およびH4テールタンパク質への修飾に主眼を置いた研究開発を行い、H4テールに対する解析法は確</p>							

	立したが、H3 テールについては、既存の分析装置・手法を用いた解析が困難を極めていた。Orbitrap Fusion 質量分析計は、平成 25 年 6 月にリリースされた最新鋭の質量分析計であり、上記課題を解決し得る機能を備えていたため当該装置を導入し、H3 テールの解析法を確立することに成功した。	
中間評価結果への対応	<p>中間評価において、「研究開発内容に対して明らかに予算規模が小さく、予算の倍加を望むが、無理であれば特定の技術に優先的に配分する等の対応が必要である。」旨の指摘があった。</p> <p>これを受け、研究開発の進捗も鑑み、平成 24 年度には研究開発項目②、平成 25 年度には研究開発項目③の推進を主眼に開発成果創出促進財源を配賦した。</p>	
評価に関する事項	事前評価	平成 22 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術開発部
	中間評価	平成 24 年度実施 担当部 バイオテクノロジー・医療技術部
	事後評価	平成 27 年度実施 担当部 ロボット・機械システム部
Ⅲ. 研究開発成果について	<p>● 事業全体</p> <p>エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンが前がん病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を 14 がん種において進めた。また、数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて、高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見出した。さらに、標的タンパク質 6 分子についてアッセイ系を確立した。</p> <p>○ 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」</p> <p>数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援した。クロマチン解析の感度を 100 倍向上させ、特異性の高い抗体開発も推進した。</p> <p>全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを実施すると共に、DNA 脱メチル化に関わるヒドロキシメチルシトシンの塩基レベル解析系を確立した。</p> <p>質量分析計を用いて、新規ヒストン修飾を同定し、数十種類のヒストン修飾組み合わせ解析法を確立した。</p> <p>○ 研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」</p> <p>腫瘍検体バンキングと組織検体を用いたエピゲノム解析を実施し、14 がん種 2,453 検体（当初目標 300 検体）について DNA メチル化プロファイリングを行った。以上の解析により、24 種類の腫瘍特異的 DNA メチル化マーカーを同定した（国内特許出願 14 件）。</p> <p>ダイレクトゼノグラフィパネル（膵がん 26 株、胃がん 30 株）を樹立し、胃がんゼノグラフィ 6 例について経時的な全エクソン変異解析を、膵がんゼノグラフィ 4 例について経時的遺伝子発現解析を行った。</p> <p>ncRNA をカタログ化して数百の腫瘍特異的 ncRNA を同定し、ncRNA 医薬標的候補 19 分子を抽出した。</p> <p>エピゲノム創薬標的候補 11 分子を抽出した。</p> <p>（診断マーカー候補 24 個、ncRNA 医薬標的候補 19 分子、エピゲノム創薬標的候補 11 分子、計 54 個（当初目標 15 個））</p> <p>○ 研究開発項目③「探索的実証研究」</p> <p>当初、実証的探索研究としてかかげた 4 標的分子を含めて合計 11 分子の機能解析を実施した。そのうち 6 分子についてアッセイ系を樹立し、3 分子については <i>in silico</i> 手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、3 分子については従来型のハイスループットスクリーニング、4 分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索した。</p> <p>○ 研究開発項目④「総合調査研究」</p> <p>次世代シーケンサー、質量分析装置の開発動向とエピゲノム研究における活用に関して、さらにゲノム・エピゲノム関連データ解析に関して調査を行った。</p>	
投稿論文	「査読付き」159 件	
特 許	「出願済」25 件、「登録」0 件、「実施」0 件（うち国際出願 11 件）	
学会発表	167 件	

<p>IV. 実用化の見直しについて</p>	<p>DNA メチル化異常はがんのスクリーニングのマーカーとして好適であり、早期診断への活用が期待される。がん種によって選択的にメチル化される遺伝子は、一次スクリーニングおよび臓器別のスクリーニングにも有効である可能性が期待される。本プロジェクトでは多数のがん選択的な DNA メチル化マーカーを抽出し、一部は特許出願も終えている。さらに、プロジェクト参画企業により、臨床血液検体を用いた検証、既存のメチル化マーカーとの性能比較も開始した。</p> <p>メチル化関連酵素は、分子ファミリー自体が比較的近年同定されたことに加えて多様であることから、優先的に阻害剤開発を進めるべくアッセイ系を構築し、参加企業での独自化合物ライブラリースクリーニングへの展開を開始した。立体構造が決定されている分子については、<i>in silico</i> での化合物デザインから結合化合物をスクリーニングして加速化をはかる一方、独自に立体構造決定を進め、標的分子からリード化合物同定までのプロセス短縮を目指している。</p>	
<p>V. 基本計画に関する事項</p>	<p>作成時期</p>	<p>平成 22 年 3 月作成</p> <hr/> <p>平成 25 年 2 月、後天的ゲノム修飾に係る研究を取り巻く現状を踏まえた改訂。</p> <p>変更履歴</p> <p>平成 26 年 2 月、健康・医療戦略推進本部が設置され、各省連携により、医療分野の研究開発を政府一体で推進することになったことを踏まえた改訂。</p>

プロジェクト用語集

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

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

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

疾患に関わるエピゲノム修飾解析は緒に就いたばかりの研究分野であり、解析基盤を確立するためには、多数の臨床検体の網羅的解析が必要となる。個別企業が解析拠点を立ち上げることは、臨床検体入手の困難さに加えて、専門的人材の育成およびエピゲノム修飾解析のための先進的技術導入に時間を要し、さらに莫大な投資も必要となるため、自律的に進展し難い状況にある。

したがって、企業、研究者および臨床家の連携の下に、エピゲノム修飾解析基盤技術を早急に確立し、迅速に実用化に展開し得る一体的なオープンイノベーションプラットフォームを構築することが喫緊の課題と言える。そのためには国の支援が不可欠であり、本事業をナショナルプロジェクトとして NEDO が実施することには意義がある。

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

1.2. 実施の効果（費用対効果）

本事業で確立するエピゲノム修飾解析基盤技術を活用して、事業実施期間内にさらに、がん診断マーカー、創薬標的候補を同定し、企業における実用化研究を開始する。

将来的には、個々のエピゲノム修飾情報に基づくオーダーメイド治療も可能になり、国民の健康維持・増進、医療財政の負担軽減、医療産業の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。

2. 事業の背景・目的・位置付け

2003 年の全ヒトゲノム解読完了により、あらゆる疾患とゲノム配列の関係が解明されると期待されたが、ゲノム配列の異常のみで説明できる疾患はごく一部であった。近年、DNA のメチル化やヒストンタンパク質のアセチル化、リン酸化、ユビキチン化といったエピゲノム修飾が、がん、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣病等の発症原因となることが相次いで明らかとなってきた。さらに、次世代シーケンサー、高精度質量分析計をはじめとするエピゲノム修飾解析手法の急速な進展により、エピゲノム修飾の制御に関与している生体内因子（タンパク質）が数百以上にのぼることが明らかとなり、これらが新しい診断マーカーや創薬標的の開発につながるものと期待されている。

技術戦略マップ 2009（平成 21 年 4 月経済産業省策定）においても、エピゲノム修飾の解析は、波及効果が高く、“画期的な医薬品の開発”、“医薬品開発の効率化”に資する重要技術として位置付けられている。

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

我が国においても、すでに大学・研究機関を中心にエピゲノム修飾研究に着手しているが、基礎研究成果を実用化に展開する産学連携体制が整っているとは言い難い。

本事業では、疾患の原因となるエピゲノム修飾を高感度で検出する解析基盤技術を構築するとともに、エピゲノム修飾に起因する複数種類のがんに対して、診断マーカー、創薬標的を見出すことを目指す。

なお、本事業は、2009年に政府が閣議決定した「新成長戦略」を受け総合科学技術会議が2010年に打ち出した「科学・技術重要施策アクションプラン」において、「ライフイノベーション」の重点的取り組み項目「がんの早期診断・治療技術の研究開発」の中の施策として位置づけられている。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

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

中間目標（平成24年度）：

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

最終目標（平成26年度）：

選定する診断マーカー・創薬標的候補15分子に対してアッセイ法を構築し、5分子については診断マーカー・創薬標的としての妥当性を実証することを目指す。エピゲノム解析技術の開発・改良により、現行の100倍以上の感度を目指す。

2. 事業の計画内容

2.1. 研究開発の内容

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

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

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

研究開発項目毎の実施項目を下表に示す。

表 研究開発項目毎の実施項目

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

以下に、研究開発項目毎の研究概要を示す。

研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

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

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

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

① DNAメチル化の網羅的解析技術開発

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

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

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

② 高感度エピゲノム解析技術開発 (組織検体の解析)

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

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

(トランスクリプトーム解析)

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

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

（高感度ヒストン修飾解析）

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

③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発

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

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

④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発

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

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

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

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

で、ヒストン H4 テールの継時的修飾変動の解析を行う。

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

(2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発

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

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

研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

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

(1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

① 臨床検体の収集と病理解析

(再発、転移を含めた経時的組織バンキング体制の確立)

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

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

(組織アレイを用いたタンパク、核酸の評価系の構築)

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

現在すでに、多数のがん組織（胃がん、肝がん、肺がん、膀胱がん、膵臓がん、腎がん、脳腫瘍、

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

② Xenograft パネルの研究開発

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

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

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

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

③ エピゲノム変異発がんモデルの研究開発

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

(既存がんモデルの解析)

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

(新たながんモデルの開発とその表現型のエピゲノム解析)

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

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

④ エピゲノム修飾の特異性を規定する非コード RNA 機能の研究開発

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

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

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

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

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

具体的には、

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

⑤ がん診断メチル化マーカーに関する研究開発

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

⑥ がん細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発

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

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

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

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

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

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

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

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

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

研究開発項目③「探索的実証研究」

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

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

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

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

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

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

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

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

(2) 探索的実証研究

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

標的分子としての妥当性を評価し、構築した基盤技術の有用性を検証する。

先行研究に基づく標的候補分子としては、以下の4分子を実証研究の対象とする。

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

研究開発項目④「総合調査研究」

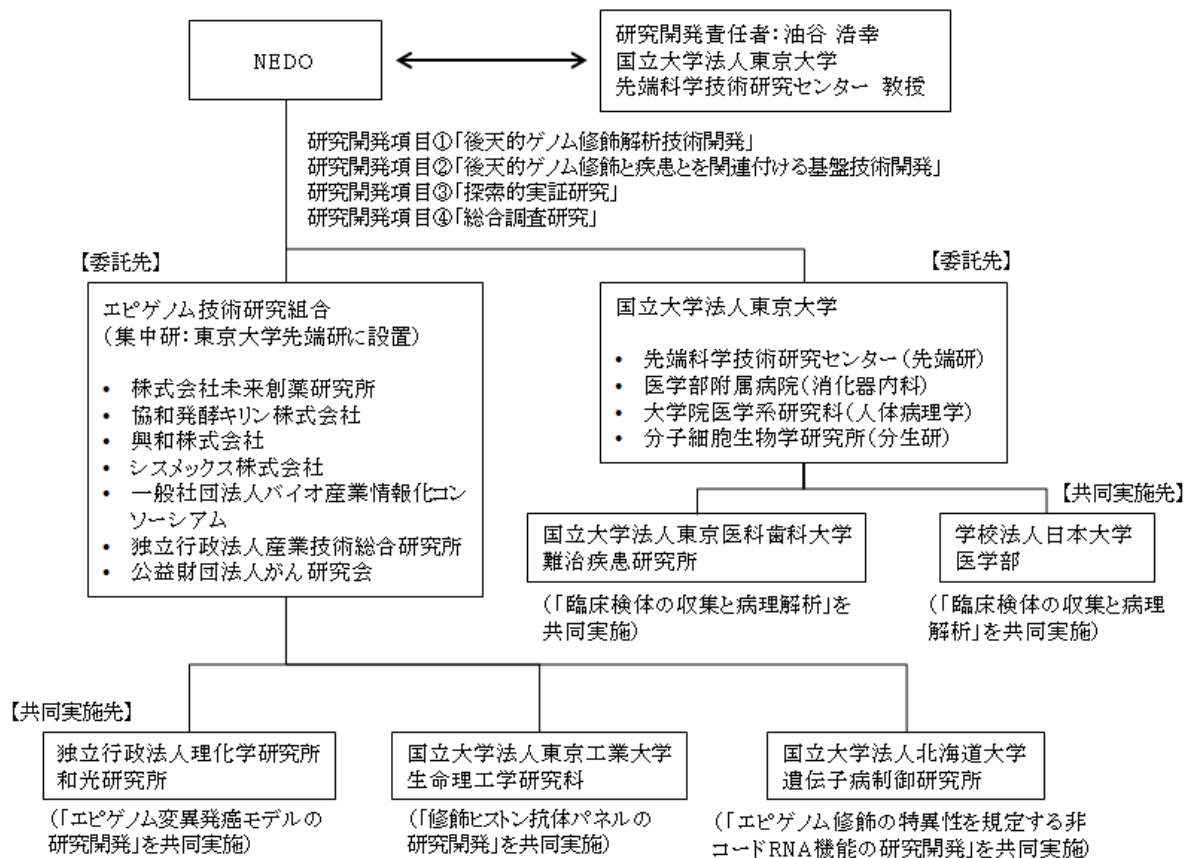
エピゲノム技術開発研究に関わる研究促進のための活動を中心とし、国内外の技術動向調査及び情報収集を行う。特に、進歩が目覚ましい次世代シーケンサーや質量分析技術の進展は、研究開発項目①及び②と密接に関係しており、この技術動向は今後のプロジェクト戦略を考える上で必要であるので、主たる調査研究として実施する。また、本プロジェクト実施内容に関連する外部動向調査（エピゲノム解析やメチル化酵素阻害などの阻害剤開発動向）を継続的に行うことも必要となる。

2.2. 研究開発の実施体制

NEDO の公募により、国立大学法人東京大学及びエピゲノム技術研究組合（集中研を東京大学先端科学技術研究センターに設置）を研究開発実施者として選定した。

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

<実施体制図>

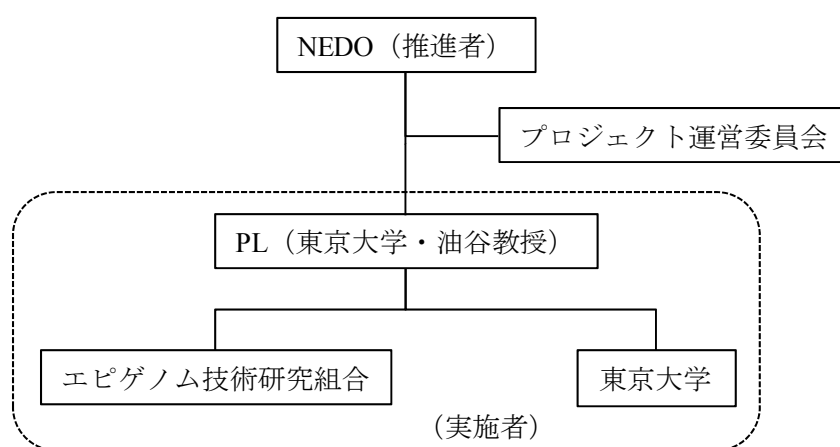


2.3. 研究開発の運営管理

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

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

プロジェクト期間内に合計 4 回の運営委員会（平成 24 年 3 月 1 日、平成 25 年 3 月 26 日、平成 26 年 3 月 6 日および平成 27 年 2 月 9 日）を開催し、研究開発方針、研究開発成果のとりまとめ等に関して具体的な提言を得るとともに、それらを適宜プロジェクト推進に反映させた。



プロジェクト運営委員会運営委員リスト

区分	氏名	所属・役職
委員長	西村 善文	横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 教授
委員長代理	吉田 稔	理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室 主任研究員
委員	伊藤 隆司*	九州大学 大学院医学研究院医化学分野 教授
	伊藤 武彦*	東京工業大学 大学院生命理工学研究科 教授
	久保田 健夫	山梨大学 大学院医学工学総合研究部 環境遺伝医学講座 教授

* 採択審査委員

2.4. 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

研究開発成果の実用化における最も重要な要素として、知的財産権に関する取り決めが挙げられる。そこで、知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て委託先に帰属させるものとした。

具体的には、エピゲノム技術研究組合において知的財産に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえてプロジェクト参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則とした。

3. 情勢変化への対応

平成23年8月に、開発成果創出促進制度を用いて180百万円を追加配賦した。これにより、最新式の次世代シーケンサー、サンプル前処理装置を導入しエピゲノム解析の大幅な効率化を図るとともに、膨大なエピゲノム解析データの保存・処理に不可欠なデータサーバーを導入した。さらに、最新式の質量分析計と電子移動解離用オプション装置を導入し、頭打ちとなっていたエピゲノム組合せ解析の感度が飛躍的に向上した。この結果、新規創薬標的分子の探索と同定が加速された。

平成24年12月に、開発成果創出促進制度を用いて324百万円を追加配賦した。これにより、次世代シーケンサー、MALDI-TOF型質量分析計を導入しエピゲノム修飾解析効率を飛躍的に向上させるとともに、単細胞セルソーターの導入によって、臨床検体からのがん幹細胞（がん発症・進展の根源となる細胞）の選別を効率的に行うことができるようになった。これら実験効率の向上による成果として、予後と明確な相関を示す肺がん特異的エピゲノム修飾因子を同定することに成功した。さらに、MALDI-TOF型質量分析計により化合物スクリーニング効率が大幅に向上した結果、上記の肺がん特異的エピゲノム修飾因子の阻害物質を取得することに成功し、この化合物を用いることにより、同定した肺がん特異的エピゲノム修飾因子の抗がん薬の標的としての妥当性が検証された。さらに、次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析効率が大幅に向上し、新規の抹消血液中がん診断マーカーを複数個同定することに成功した。（特許出願済み）

平成25年11月に、開発成果創出促進制度を用いて110百万円を追加配賦した。これにより、Orbitrap Fusion質量分析計の導入し、新規のがん特異的創薬標的の同定が大幅に加速された。本プロジェクトでは、H3およびH4ヒストンテールタンパク質へのエピゲノム修飾に主眼を置いた研究開発を行っており、H4タンパク質に対する画期的なエピゲノム修飾パターン解析法は順調に確立したが、H3タンパク質については、H3タンパク質の分子量がH4タンパク質に比して大きいがゆえに、既存の分析装置・手法を用いた解析法の確立は困難を極めた。Orbitrap Fusion質量分析計は、平成25年6月にリリースされた最新鋭の質量分析計であり、上記課題を解決し得る機能を備えていたため当該装置を導入し、H3タンパク質のエピゲノム修飾パターン解析法を確立することに成功した。

4. 中間評価結果への対応

中間評価において、『研究開発内容に対して明らかに予算規模が小さく、予算の倍加を望むが、無理であれば特定の技術に優先的に配分する等の対応が必要である。』旨の指摘を受けた。

これを受け、研究開発の進捗も鑑み、平成24年度には研究開発項目②、平成25年度には研究開

発項目③の推進を主眼に開発成果創出促進財源を配賦した。

5. 評価に関する事項

平成 24 年 7 月に中間評価を実施した。

事後評価は平成 27 年度に実施する予定である。

III. 研究開発成果について

1. 事業全体の成果

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

既に DNA メチル化、ヒストンアセチル化については DNA メチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤が抗腫瘍薬として開発されてきた。一方、近年のエピゲノム解析技術の進歩により多彩なエピゲノム修飾が存在することが解明されつつある。例えば、DNA 脱メチル化におけるヒドロキシメチルシトシンの役割の解明をはじめとして、ヒストンや DNA の脱メチル化機構について明らかにされたのはまさにこの十年間のことである。そこで疾患を特徴付けるような「後天的」修飾を同定し、制御する治療法は新たな創薬分野となり、エピジェネティクス研究はまさに疾患研究の重要な一分野となっている。

一方、ゲノム、プロテオーム解析において次世代シーケンサーや高感度質量分析装置などの技術革新の速度はますます加速化しつつあり、一企業がキャッチアップすることは困難であり、先進的解析技術および成果をイノベーションに生かしていくためにはアカデミアが果たすべき役割が大きい。また、「京」等のペタフロップスコンピュータの開発をはじめとする計算科学の進歩に伴い、分子動力学による立体構造予測が実用的レベルにまで達しつつある。これら産官学のリソースを集中研に結集したオープンイノベーション体制から *first in class* の医薬品開発を目指すプロジェクトである。これまでに、参画企業4社から常時10名程度の研究者が集中研において研究を実施してきた。

各年実施の運営会議でのコメント・意見でも、基盤的な技術開発と並行し創薬・診断薬開発を目指すべきとあり、「がん」に注力して創薬標的や診断薬マーカーの探索、評価を行った。

以上の目的のためには良質なヒト腫瘍検体の確保および解析が必須であり、病理学教室に長年保存されたアーカイブである組織標本の利用に加え、創薬研究に繰り返し利用するにあたり、よりヒトの腫瘍検体に近い材料としてゼノグラフトマウスの系統的樹立を行い、膵がん26例および胃がん30例についてゼノグラフトマウスを樹立することができた。それらのうち、胃がんゼノグラフト6例については経時的な全エクソン変異解析を、膵がんゼノグラフト4例については経時的な遺伝子発現解析を行った。

非コード RNA (ncRNA) が、エピゲノム修飾の特異性を規定する可能性が浮上し注目を集めている。エピゲノム制御を標的とした医薬品開発を目指す上で、エピゲノム制御の特異性を規定する ncRNA の同定と作用機構の解明は重要で、当該研究開発を行った。ncRNA をカタログ化して数百の腫瘍特異的 ncRNA を同定し、その後の絞り込みの結果 ncRNA 医薬標的候補を19分子見出した。

創薬プロセスにおけるバイオマーカーの重要性が最近注目されている。エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンは前がん病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を14がん種2,453検体において進めた。また、数十に及ぶヒストン修飾を個別に測定する技術は次世代シーケンサーを用いて確立されてきた一方で、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わせられているかについては適切な解析技術がなかった。この解析法について高感度 LC/MS/MS を用いた手法を確立し、数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見出した。

実証的探索研究として当初かかげた4標的分子を含めて合計11分子の機能解析を行った。とりわけ、標的分子の妥当性の検証には標的分子の活性阻害活性を有する分子が腫瘍に与える影響を知ることが重要である。3分子については *in silico* 創薬手法を用いてシード化合物が得られた。また、2分子で従来型の HTS、4分子で結合ペプチドスクリーニングを実施した。スクリーニングに加え、3標的分子について X 線結晶解析に成功し、さらに阻害剤との共結晶解析も検討した。

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

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

事業全体の成果のまとめ

目 標	研究開発成果	達成度
事業全体	<p>エピゲノム標識、とくに DNA メチル化の異常パターンが前がん病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしての DNA メチル化マーカー開発を 14 がん種において進めた。また、数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて、高感度 LC/MS/MS を用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見出した。さらに、標的タンパク質 6 分子についてアッセイ系を確立した。</p>	達成
研究開発項目① 「後天的ゲノム修飾 解析技術開発」	<p>数十万に及ぶ CpG サイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援した。クロマチン解析の感度を 100 倍向上させ、特異性の高い抗体開発も推進した。全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを実施すると共に、DNA 脱メチル化に関わるヒドロキシメチルシトシンの塩基レベル解析系を確立した。質量分析計を用いて、新規ヒストン修飾を同定し、数十種類のヒストン修飾組み合わせ解析法を確立した。</p>	達成
研究開発項目② 「後天的ゲノム修飾 と疾患とを関連づける 基盤技術開発」	<p>腫瘍検体バンキングと組織検体を用いたエピゲノム解析を実施し、14 がん種 2,453 検体（当初目標 300 検体）について DNA メチル化プロファイリングを行った。以上の解析により、24 種類の腫瘍特異的 DNA メチル化マーカーを同定した（国内特許出願 14 件）。ダイレクトゼノグラフトパネル（膵がん 26 株、胃がん 30 株）を樹立し、胃がんゼノグラフト 6 例について経時的な全エクソン変異解析を、膵がんゼノグラフト 4 例について経時的な遺伝子発現解析を行った。ncRNA をカタログ化して数百の腫瘍特異的 ncRNA を同定し、ncRNA 医薬標的候補 19 分子を抽出した。エピゲノム創薬標的候補 11 分子を抽出した。（診断マーカー候補 24 個、ncRNA 医薬標的候補 19 分子、エピゲノム創薬標的候補 11 分子、計 54 個（当初目標 15 個））</p>	達成
研究開発項目③ 「探索的実証研究」	<p>当初、実証的探索研究としてかかげた 4 標的分子を含めて合計 11 分子の機能解析を実施した。そのうち 6 分子についてアッセイ系を樹立し、3 分子については <i>in silico</i> 手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、3 分子については従来型のハイスループットスクリーニング、4 分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索した。</p>	達成
研究開発項目④ 「総合調査研究」	<p>次世代シーケンサー、質量分析装置の開発動向とエピゲノム研究における活用に関して、さらにゲノム・エピゲノム関連データ解析に関して調査を行った。</p>	達成

年度毎の特許、論文、学会発表の件数

区分 年度	特許出願			論文 (査読付き)	学会発表
	国内	外国	PCT ¹ 出願		
H22FY	0件	0件	0件	22件	18件
H23FY	1件	0件	0件	33件	52件
H24FY	4件	1件	1件	29件	39件
H25FY	2件	0件	5件	36件	29件
H26FY	6件	4件	0件	39件	29件
H27FY	1件	-	-	-	-
計	14件	5件	6件	159件	167件

1 : Patent Cooperation Treaty : 特許協力条約

2. 研究開発項目毎の成果

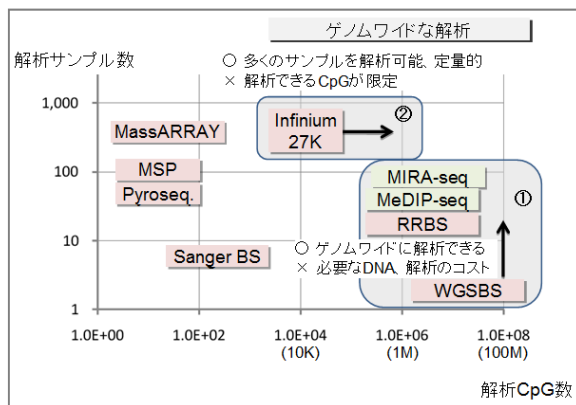
2.1. 研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

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

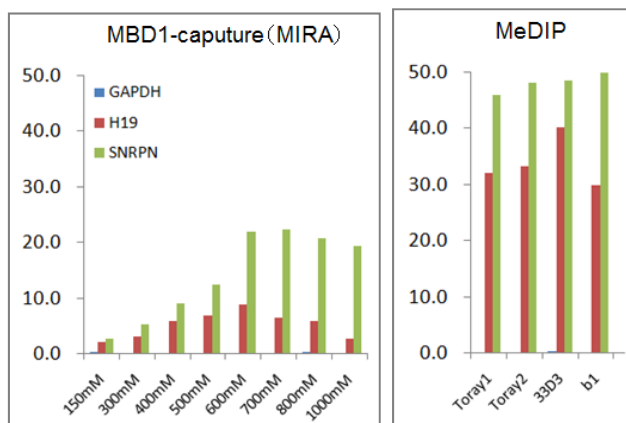
① DNA メチル化の網羅的解析技術開発

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

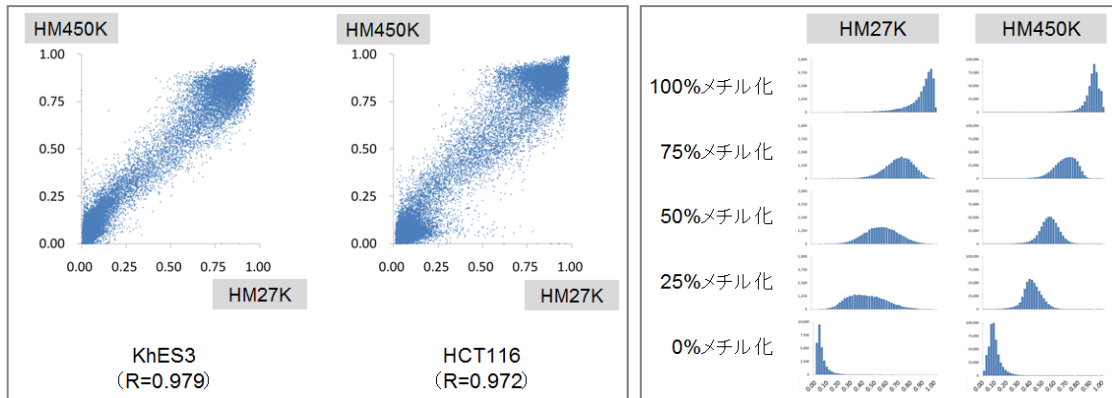
450K アレイでも 1 遺伝子あたり平均 7 プローブ程度であり、プロモーター領域の十分な情報は得られない。この欠点を補完する目的で、同一検体から、MeDIP あるいは MBD カラム法で捕捉・濃縮したメチル化 DNA の配列解析を実施した。本手法は、CpG 密度の高い CpG アイランド領域の解析に特に有効であり、ゲノム全域をカバーしうることから、プロモーター以外の CpG アイランドについても、新規異常メチル化部位の探索が可能となる。



MBD カラムあるいは MeDIP 法により網羅的メチル化解析に必要なゲノム DNA の最少使用量を臨床組織でも広く応用可能な 1 μg に設定し、プロトコル条件の最適化や改良を行った。MBD カラム法では、500 nM を越える高い塩濃度のバッファーで洗浄した際に、メチル化の陽性領域である H19 と SNRPN の 2 カ所のコントロール領域で、高い濃縮率を得ることができたが、後述する抗体を用いた MeDIP 法の方が、より高い濃縮率を示した。MeDIP 法に関しては、1 μg の開始量で 10 ng の免疫沈降産物を安定的に得られるようプロトコルの最適化を行い、複数の抗メチルシトシン抗体でいずれも再現よく、20 倍を越える高い濃縮率を確認することができた。



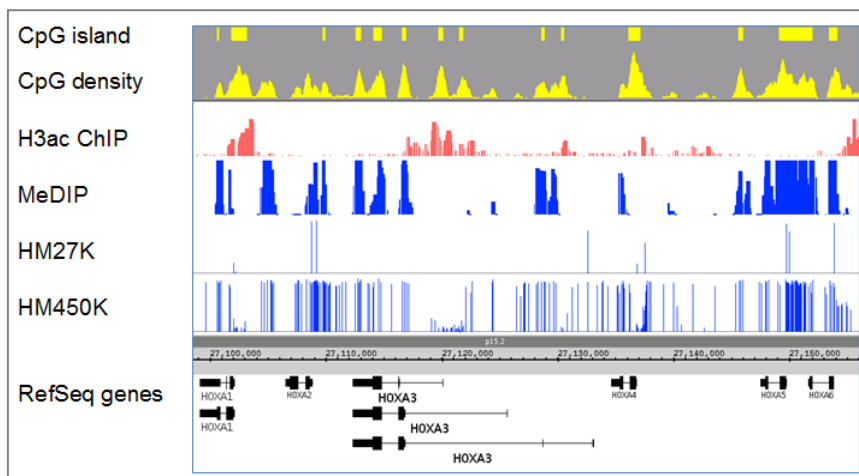
多数検体のハイスループットな異常メチル化部位のスクリーニングには、エピジェノタイピングアレイの高い定量性が必要とされる。従来使用されてきた2万7千か所を解析できるHM27Kと同等の正確性を有するかどうか、新しく45万か所を解析できるようにデザインしたHM450Kの評価を行った。下図に示すように、ヒトES細胞(KhES3)、がん細胞株(HCT116)を用いた検討では、いずれの細胞株においても、HM27KとHM450Kの間で高い相関を確認することができた(左下図)。



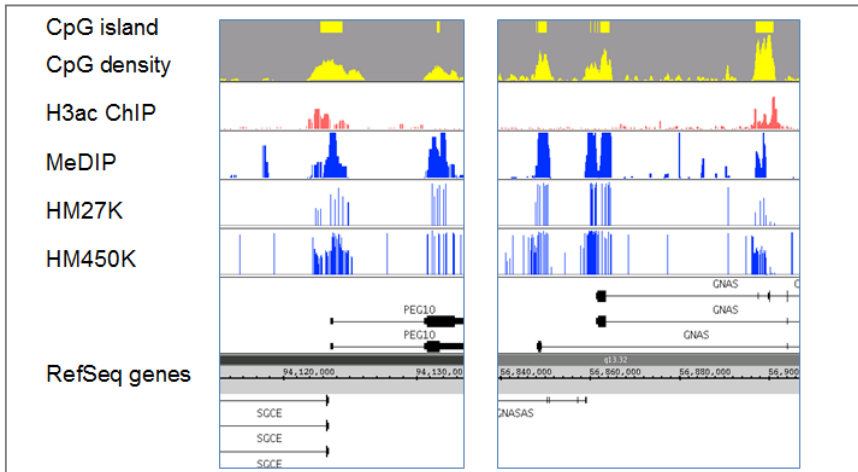
また、人工的に合成したメチル化コントロールゲノム(100%、75%、50%、25%、0%)を用いて、比較検討を行った結果、HM450KにおいてもHM27K同様に25%の違いを良好に検出することができた(右上図)。

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

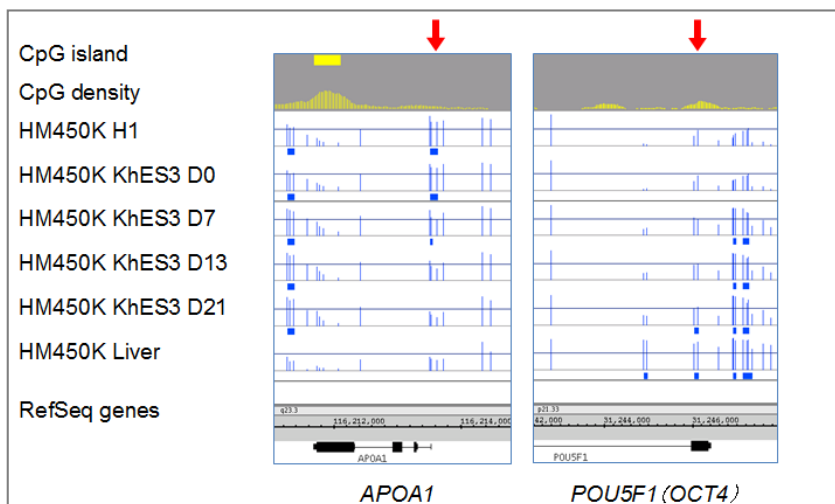
MeDIP法で検出したメチル化領域は、HM27Kではプローブ密度が低いために一部しか情報が得られないが、HM450Kではほとんどが一致しており、CpGアイランド以外の領域もカバーされている。



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



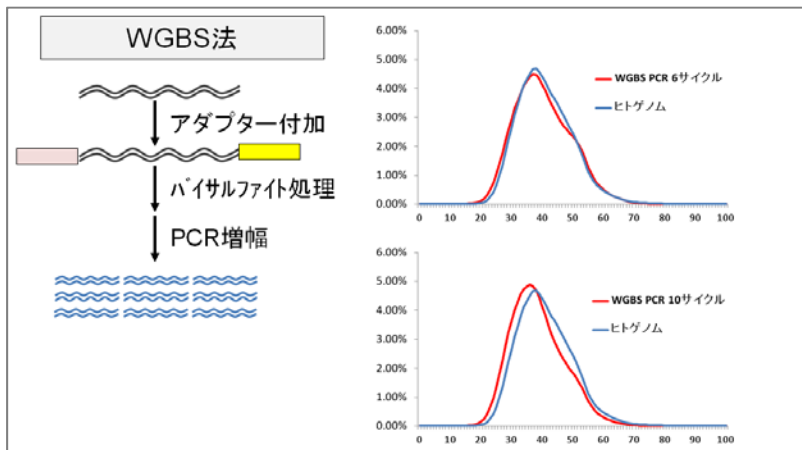
細胞分化の過程では、メチル化状態がダイナミックに変化するが、こうした解析でもメチル化の定量性が求められる。ヒト ES 細胞を肝細胞へと誘導した際に、肝臓特異的に発現する *APOA1* はプロモーター領域のメチル化が減少している。逆に、幹細胞で発現する *POU5F1* (*OCT4*) は転写開始点付近において徐々にメチル化が増加していることが確認できた。



以上により、多数のサンプルについて遺伝子プロモーター領域に特化して定量性よく検出できるアッセイ系が確認できた。本手法は、多数検体での臨床応用可能なマーカー領域の選定などに極めて有効であると考えられる。

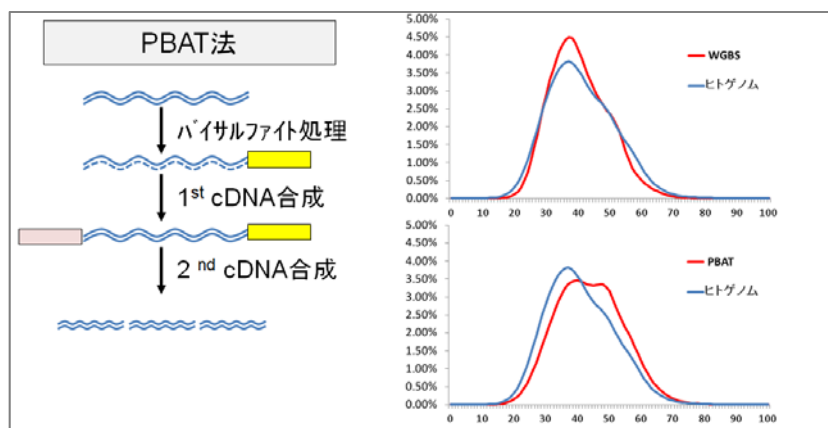
全ゲノムの CpG を 1 塩基レベルの解像度で解析しうる方法が、WGBS 法 (whole-genome bisulfite sequencing) である。上記のメチル化 DNA を濃縮する手法では、CpG の密度の高い CpG アイランドの領域はすべてカバーできるが、CpG 密度の低い領域は解析が困難である。また、メチル化 DNA の濃縮により検出しているため、定性的なメチル化情報しか得られない。一方、WGBS 法は十分なリード数が得られれば、メチル化状態の定量的な評価が可能である。現行の次世代シーケンサーの性能では、解析コストが膨大となるだけでなく、情報解析の負荷も非常に大きいことから、世界的にみても ES 細胞や線維芽細胞など解析対象は依然限られており、基礎研究レベルで用いられているのが現状である。しかしながら、ES 細胞特異的に広範囲にみられる非 CpG のシトシンメチル化の発見など、既存の手法では得られなかった新たなメチル化情報の発見につながる事が期待され

ている。加えて、バイサルファイト変換時のゲノム分解の少ないサンプル調整法が必要とされているため、WGBS 法のパフォーマンスの評価に加えて、より少量の DNA での検出系の検討を行った。

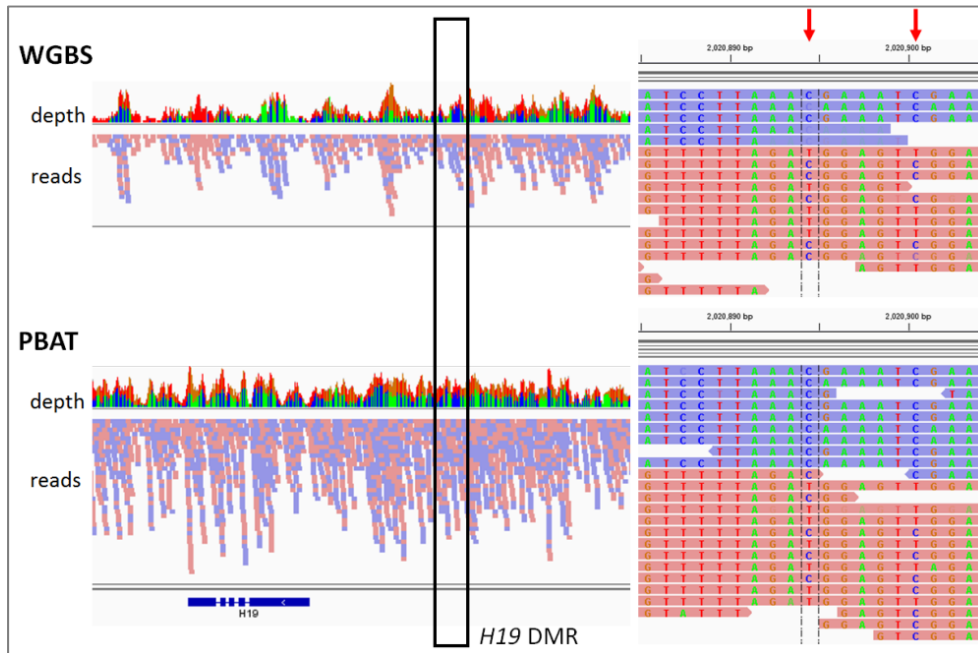


免疫沈降法による mC および hmC の濃縮法と、少量 DNA のゲノムシーケンス法を組み合わせ、シトシン修飾のより詳細なプロファイル情報を明らかにする。取得したデータに関しては、450K エピジェノタイピングアレイでの解析結果とも比較検討を行う。WGBS 法を 100 ng の DNA からバイサルファイトシーケンスするには PCR 増幅の回数を増やす必要があり、配列のバイアスが懸念されるため、100 ng から PCR を行わずにシーケンスが可能な PBAT 法と WGBS 法との比較検討を行った。PCR 6 サイクルが十分な NGS ライブラリを得るための必要最小サイクル数であったが、さらに 10 サイクルまで増幅を加えると、上記のようにシーケンス領域が AT-rich の領域に偏る傾向がみられた。こうしたシーケンス領域の偏りは、CpG アイランドなどの GC の多い領域の depth が薄くなる可能性をはらんでおり、鋳型 DNA が十分に得られる場合には避けるべきと考えられる。

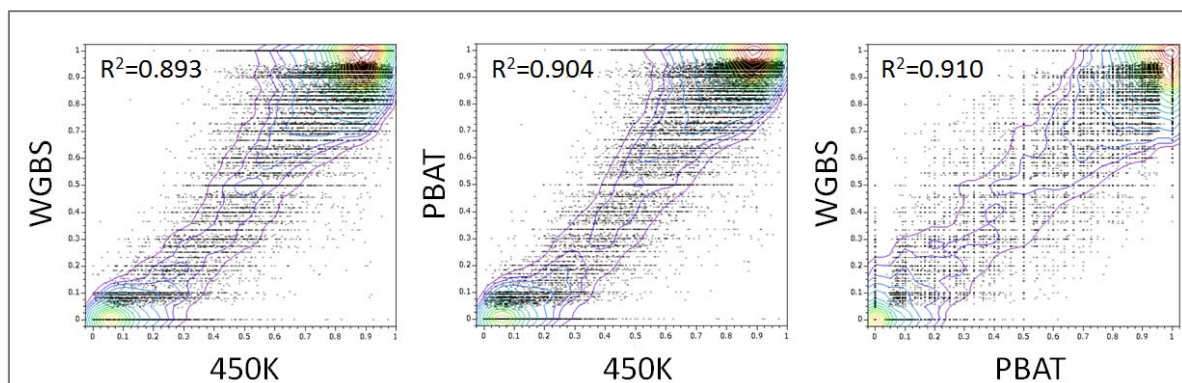
バイサルファイト処理の後にアダプターを付加する PBAT 法についても比較検討を行った。PBAT 法では PCR を行わずにライブラリを作成できるが、100 ng の鋳型 DNA から十分量のライブラリが得られた。シーケンス領域の GC 含量を検討した結果、下図に示すように、WGBS 法と比べて GC-rich の領域がより読まれやすい傾向がみられた。GC 含量の多い CpG アイランドを解析対象とする場合には WGBS 法より効率よくメチル化情報を得ることができると考えられた。



次に、WGBS 法と PBAT 法のメチル化率の定量性についても比較検討を行った。下図は、メチル化アレルと非メチル化アレルが 50%ずつ存在する *H19* の DMR 領域である。WGBS 法と PBAT 法の双方において、メチル化リードと非メチル化リードがシーケンスされているのがわかる。メチル化リードと非メチル化リードを各 CpG サイトでカウントして、その CpG サイトのメチル化率を算出する。

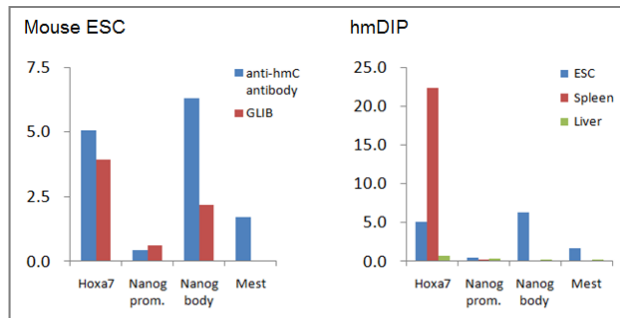


メチル化率の算出にはある程度のリード数がカバーされていないと正確な算出ができないため、リード深度が 10 を越える CpG サイトにおいて、メチル化アレイ HM450K が設計されている CpG サイトのメチル化率を比較した。その結果、WGBS 法、PBAT 法ともに、450K データとも非常に高い相関を示し、WGBS 法と PBAT 法の間でも高い相関性が認められた。

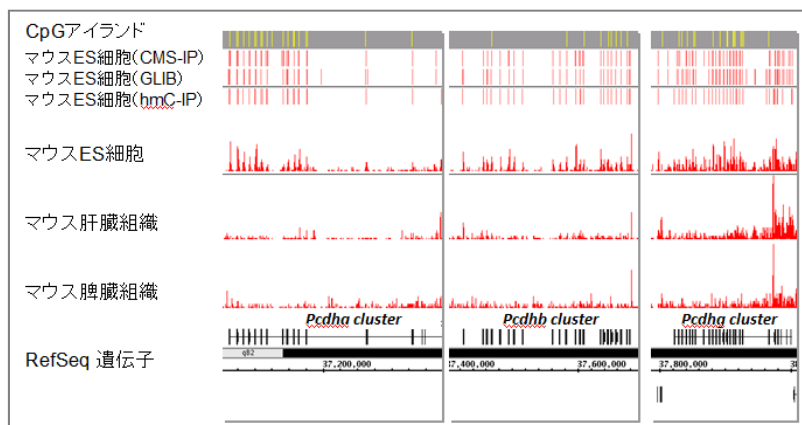


以上より、WGBS 法および PBAT 法では、シーケンス対象となる領域の GC 密度には偏りがみられるものの、十分なリード深度が得られた領域についてはメチル化率の定量性は両者ともに高いことが確認できた。

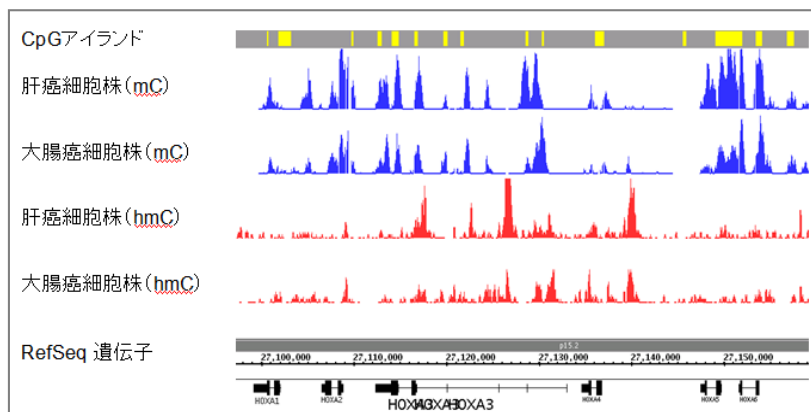
次に、近年発見された新規 DNA 修飾であるヒドロキシメチルシトシン (hmC) の検出系の確立を行った。hmC はバイサルファイト変換による方法のみではメチルシトシン (mC) との判別が不可能であるため、最初に抗 hmC 抗体を用いた免疫沈降法 (hmDIP 法) によるゲノムワイドな検出系の確立を行った。抗 hmC 抗体での hmC 修飾領域の回収効率をマウス ES 細胞における hmC 修飾領域で確認した。ビオチンを付加したグルコースを反応させて回収する GLIB 法と比較しても、遜色ない効率であり、ES 細胞以外にもマウスの正常臓器のゲノム DNA でも検出することができた。



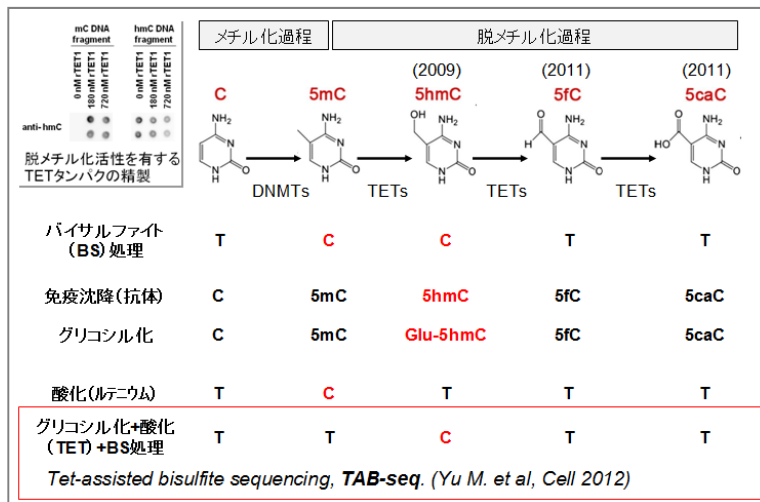
この方法を用いて、実際にマウス ES 細胞における hmC 修飾領域のゲノムワイドなマッピングを行った (hmDIP-seq 法)。hmC 領域を数多く有することが知られているプロトコドヘリンクラスター領域の解析結果を以下に示す。上段に示した既報での陽性領域と一致して、hmDIP-seq 法で良好に検出できることを確認した。



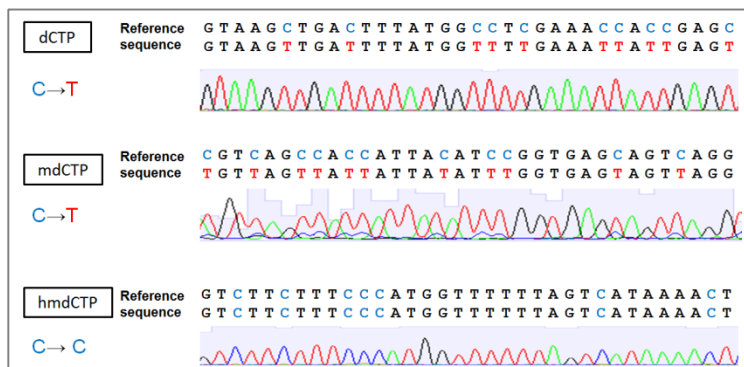
さらに、2種類のがん細胞株を用いて、mC と hmC のマッピングを行った。以下に HOXA クラスター領域の解析結果を示す。それぞれの細胞株において、mC と hmC が異なる領域に分布していることが確認できた。



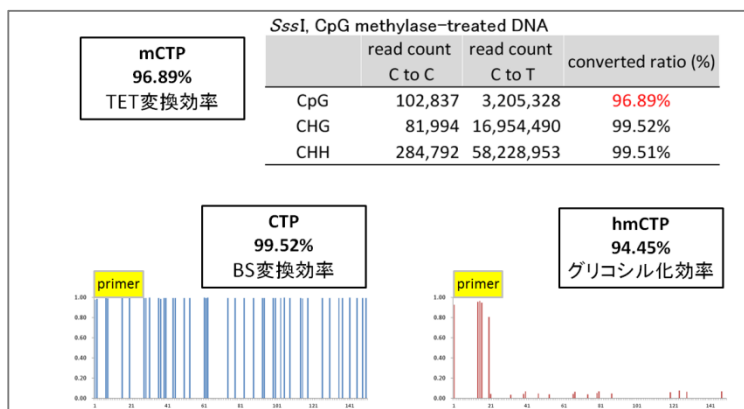
さらに、ヒドロキシメチルシトシンについても、1塩基レベルでの解像度での解析を可能にするために、TAB-seq法の確立を行った。hmCをmCと区別するためには、バイサルファイト処理を行う前にhmCに対してグリコシル化を行い、合成TETタンパクに対する酸化反応からの保護を行う。これによって、糖が付加されたhmCは酸化を受けないためバイサルファイト処理後のPCR反応の際にCのまま複製されるが、mCはfCやcaCまで酸化されTとして複製される。



人工的に合成したDNA断片を用いた検討においても、以下に示すように、グリコシル化、TAB反応およびバイサルファイト変換の各ステップが非常に効率よく進むことで、mCとhmCが高精度に検出できていることがわかる。



この変換効率を、次世代シーケンサーを用いて定量した結果、グリコシル化効率は94.45%、TET変換効率は96.89%、バイサルファイト変換効率は99.52%と、いずれのステップにおいても良好な反応効率を得られていることが確認できた。



② 高感度エピゲノム解析技術開発

(組織検体の解析)

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

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

(高感度ヒストン修飾解析)

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

免疫沈降を遂行する過程で、最も重要とされるのが超音波処理による DNA の物理的断片化であるが、小スケールの細胞を用いると DNA 断片効率の低下が見られた。原因として容積 (バッファ一量) に対する DNA 量が極端に少ないためにチューブ内での摩擦力が低下し、断片化効率の低下に繋がったと考えられた。そこで、模倣 HeLa DNA としてバクテリオファージ λ DNA を $2\mu\text{g}$ 加えることで断片化効率が向上した (図 1)。

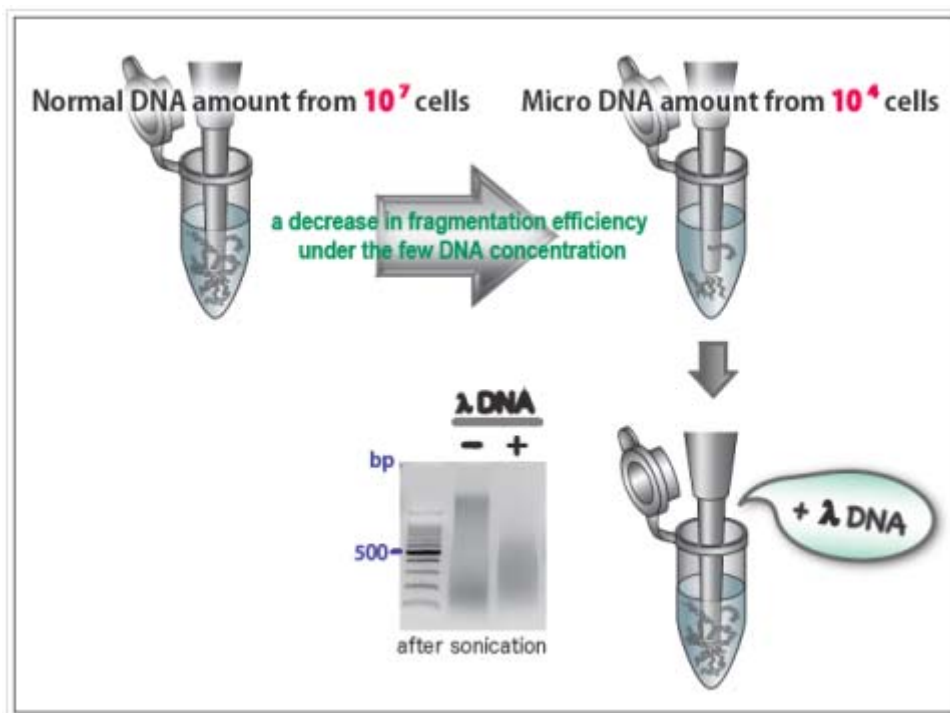


図 1

免疫沈降後、 λ DNA は IP 分画には含まれず、WCE 分画で混入したものについてはシーケンス

後の解析でADNAのみ排除することが可能である。この方法により Lysate を作成し、10,000 個の HeLa 細胞でも染色体免疫沈降段階までは ChIP-qPCR により、結合領域が濃縮されていることが確認できた。シーケンスでの泳動には、免疫沈降された DNA (ChIPed DNA) 断片にアダプターを付加し、ライブラリーを作製する必要がある。通常、免疫沈降された DNA は数十 ng が最低限度とされている。小スケールからの ChIPed DNA はあまりにも少量 (100 pg 程度) であることから、ほとんど有効なデータを得ることができなかつた。そこで、ChIPed DNA の PCR、あるいは IVT 法による増幅を行い、あらかじめ増幅した DNA を用いてライブラリーを作製し、それをシーケンするという方法を取らざるを得ないと結論した。

増幅法についてはまず今回用いた抗 H3K79me 抗体による ChIPed DNA を鋳型にしてランダム PCR 増幅法を試みたが、ランダム PCR 増幅法は増え易い、あるいは増えにくい等の増幅バイアスがかかってしまい、特に非特異的な繰り返し配列を多く含むヒト細胞を用いた免疫沈降産物の増幅には不向きであった。また、プライマー自身の増幅により良好な結果は得られなかつた。

そこで、プライマー同士のアニーリングを抑制するために予めヘアピン構造を持つプライマーを用い、fidelity の高いポリメラーゼ酵素を用いた PCR による増幅を行った。ヘアピン増幅前後の ChIPed DNA を qPCR による定量により評価した結果、少なくとも 10 の 5 乗の細胞までは濃縮度が低下することはなかつた。ただ、検出に耐えうるレベルの S/N 比を確保できたのは既知の H3K79me 結合プロファイル部位の半分程度であった。

非特異的な繰り返し配列の増幅、あるいはプライマー自身の増幅を極力抑えるために、T7 RNA ポリメラーゼを使用する *in vitro* transcription (IVT) 増幅法を試みた。ChIPed DNA を鋳型とし、大量かつ正確に一本鎖 RNA を合成した後に増幅する方法であり、最もバイアスがかかりにくい増幅法である。

10 の 6 乗、5 乗、4 乗の HeLa 細胞を用い抗 H3K79me 抗体による免疫沈降を行い、得られた ChIPed DNA を IVT 法により増幅後、シーケンスを試みた。その結果、10,000 細胞においても十分な S/N 比をもつタンパク結合プロファイルを得た (図 2)。H3K79me の結合領域は、10 の 6 乗細胞や既知の ES 細胞のリファレンスと全体の 93% のピークで一致した。IVT 法による ChIPed DNA の増幅は、小スケールにおける微量サンプルの免疫沈降法として最適条件の一つであると言える。

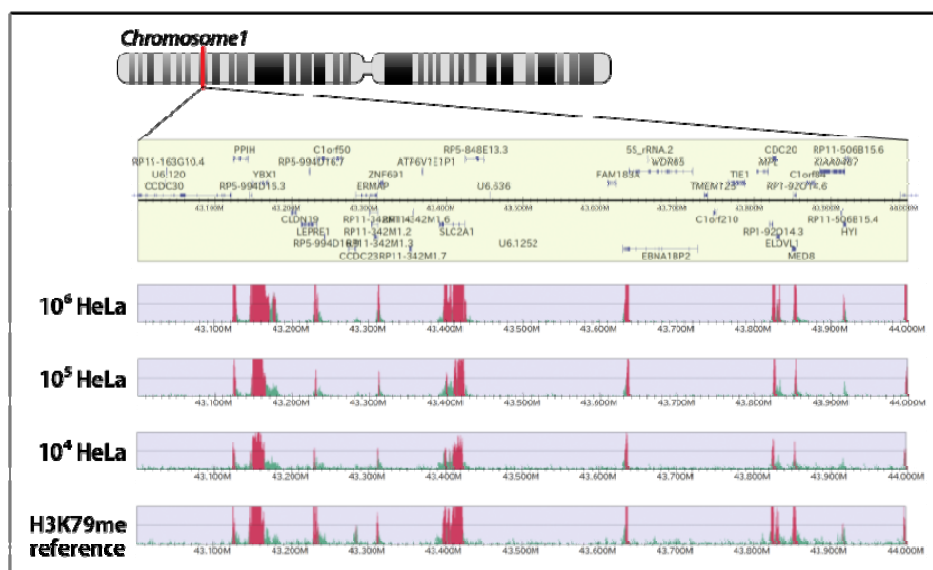


図 2 少数細胞からの ChIP-seq による H3K79me 結合領域 (10,000 個の HeLa 細胞から H3K79me 結合プロファイルを得ることに成功。)

そこで、マウス blastocyst を用いて 10,000 細胞からの ChIP-seq 解析の試行を開始した。HeLa 細胞

でのタンパク結合プロファイルが可能であり、かつ免疫沈降効率が高い H3K4me3 の ChIP-seq を試みた。HeLa 細胞と同様、blastocyst 10,000 細胞にλDNA を加えた条件で DNA を断片化し、得られた微量 ChIPed DNA を IVT 法により増幅しシーケンスした。その結果、得られたピーク数が極端に少なく、またマウス ES 細胞のリファレンスとの比較においてもピークの重なりは、わずか 17% に留まり、良好な結果を得ることができなかった (図 3)。

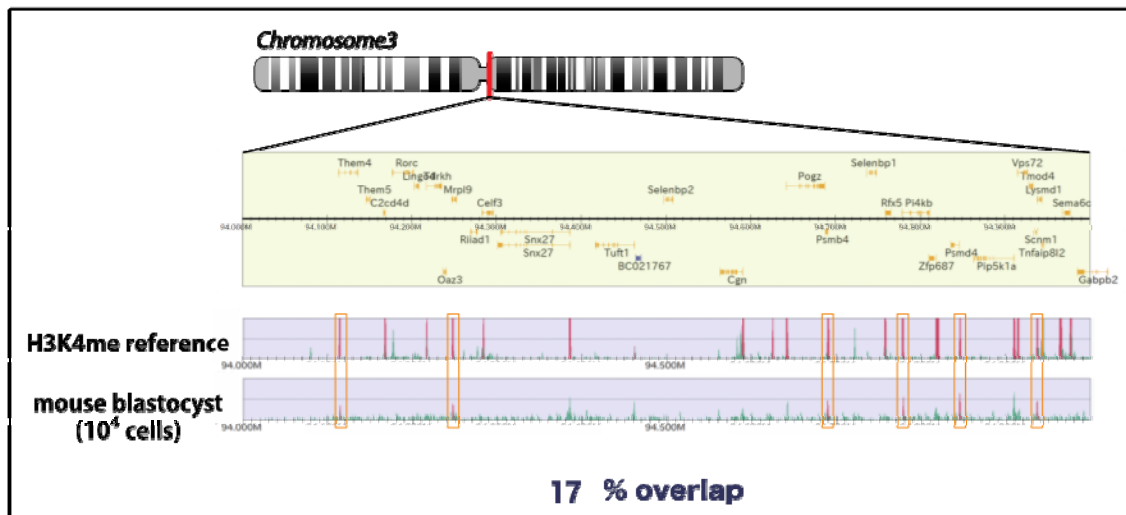


図 3 マウス blastocyst からの ChIP-seq による H3K4me 結合領域 (10,000 個の blastocyst 細胞から得られた H3K4me 結合領域はリファレンスと 17%で一致。)

Blastocyst の非常に粘着性のある性質によるチューブの壁面への付着が原因で、正確に 10,000 細胞を回収できず最低細胞数を大きく下回ったことが推測された。また、HeLa 細胞とマウス blastocyst 細胞の溶解度の違いも影響していることが考えられた。まず、blastocyst のチューブへの粘着を防ぐために、lysate 作成の前処理として PVP (ポリビニルピロリドン) で被覆した。通常、免疫沈降を遂行する過程では DNA 断片の長さを確認し、尚且つ SDS-PAGE を用いて実験が成功していることを確認づける。しかし、小スケールでの免疫沈降の場合、実験過程が成功しているか否かの確認は不可能であるが、今回用いた ChIPed DNA の IVT 法による増幅後、cDNA 量を測定することで評価できる。新たに導入した blastocyst の PVP による処理により、ChIPed DNA の増幅効率が向上したことから、免疫沈降の改善が証明された。シーケンスの結果、マウス ES 細胞での H3K4me の結合プロファイルと比較して 93%のピークが一致しており (図 4 上)、検出ピークは以前と比べて遺伝子上流に位置する割合が増加していたことは (図 4 下)、得られた結果の信頼性の高さを示している。マウス blastocyst 細胞においても 10,000 細胞で ChIP-seq によるタンパク結合プロファイル解析が可能な系を確立できた。

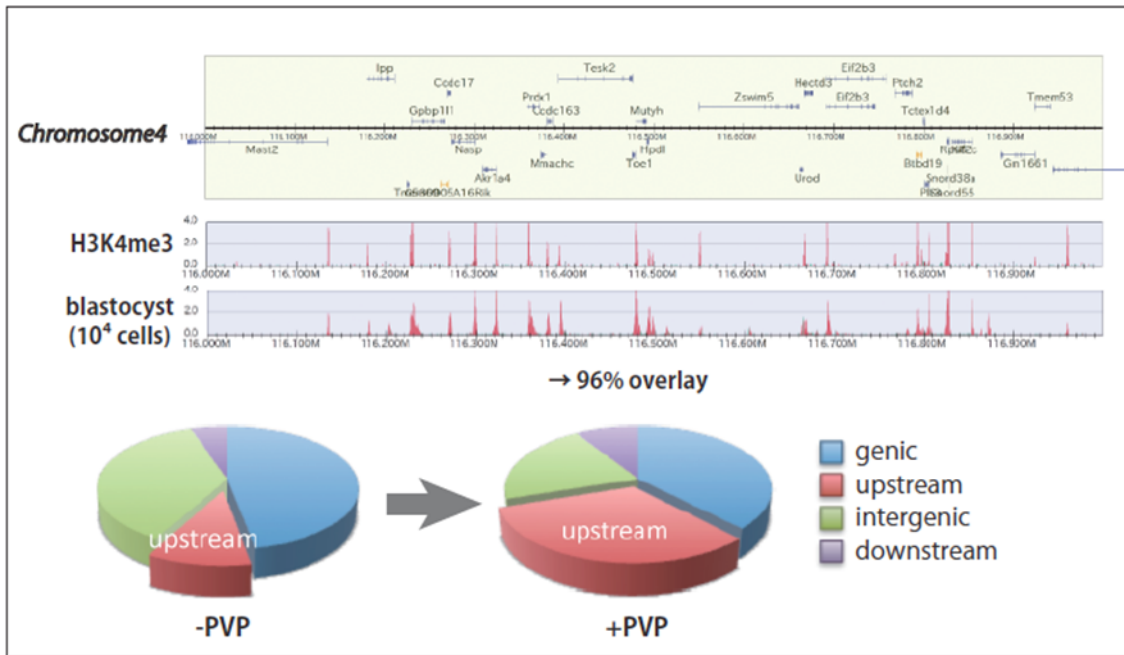


図4 マウス blastocyst からの ChIP-seq による H3K4me 結合領域
 (上: PVP 処理した免疫沈降はリファレンスと 96% の一致、下: PVP 処理により遺伝子上流に位置するピークが増加した。)

この開発系を用い、木村らより得たヒストン修飾特異的の抗体を用い、10,000 細胞からの ChIP-seq 解析に用いる抗体をスクリーニングした。その結果、現在までに、上記の H3K4me3、H3K27me3 に加え、H3K27ac、H3K9me3 についても 100 万細胞を用いた場合検出される領域の 6-8 割を 1 万細胞でも検出可能となり、系の少数細胞化に成功した (図 5)。

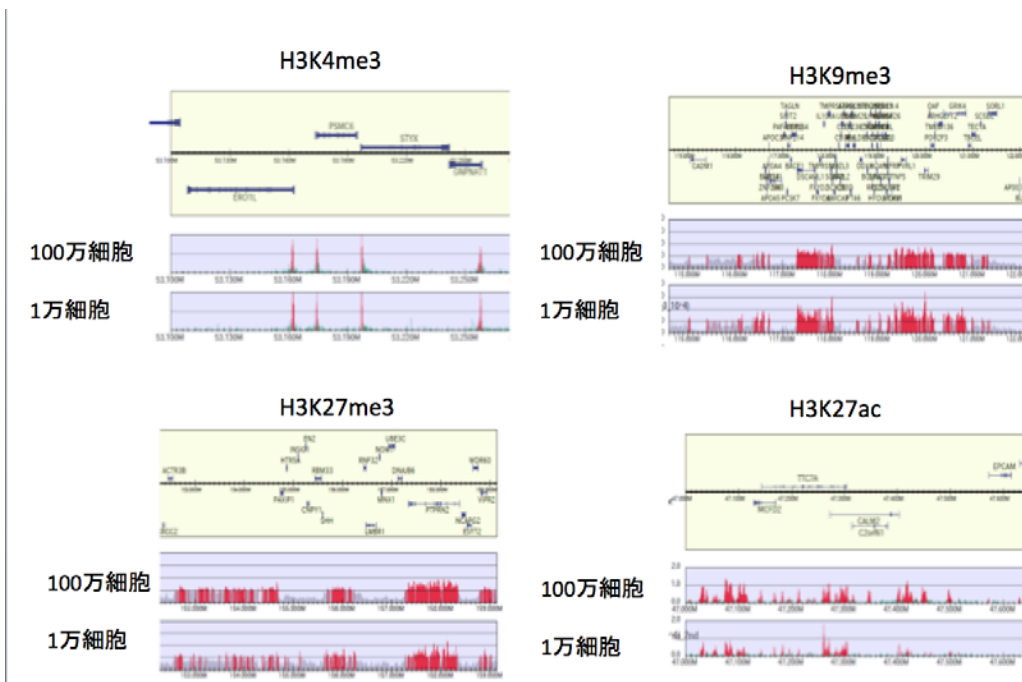


図5 ヒト IMR90 細胞からの ChIP-seq による H3K4me、H3K9me3、H3K27me3、H3K27ac の結合領域 (100 万細胞と 1 万細胞を用いた場合の比較)

③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発

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

さらに、ヒストン H3 の非修飾型のリジンに対する抗体を作成し、アセチル化、非修飾、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化の 5 つのエピゲノム状態の区別を可能にした。実際、ChIP-seq や免疫染色による解析では、非修飾型の H3K9 と H3K27 の特徴的な局在性が見られた。

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

H4 に関しては、最近がん細胞で見つかった K5 のメチル化に対する抗体も作成した。H4K5 のメチル化は存在量が少ないことから、検出は容易ではないものの、免疫染色レベルでの検出が可能になっており、今後のメチル化酵素の阻害剤開発への応用が期待できる。

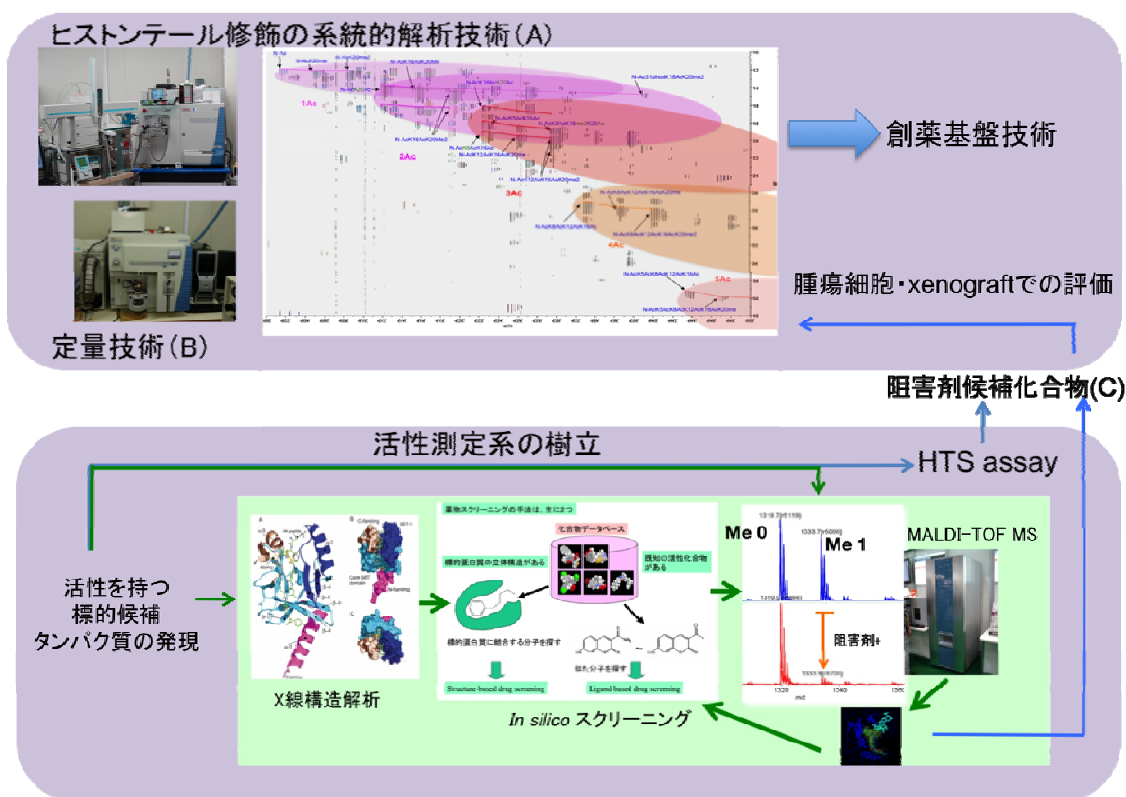
以上のように、ヒストン修飾特異的抗体の開発と評価を進め、細胞のエピゲノム状態を網羅的あるいは標的を絞った解析法の発展に寄与した。今後、これらの抗体が創薬や薬効評価に応用できると期待できる。

④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発

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

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

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



研究開発項目③ではこれらの項目①、③の技術を組み合わせて実証研究を行う

図1 研究開発項目①-(1)-④と研究開発項目③の概要

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

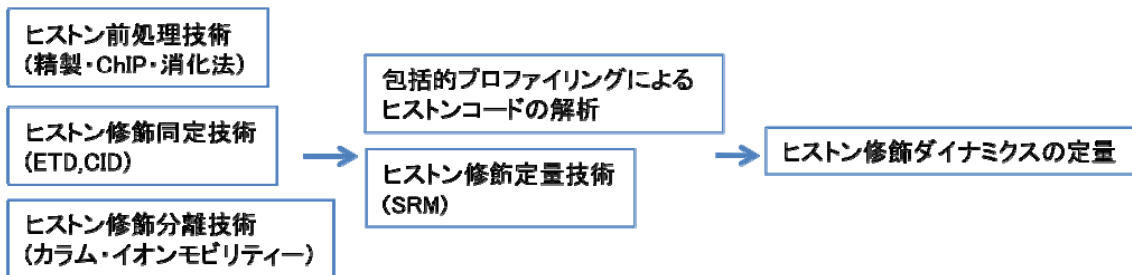


図2 検討項目

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

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

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

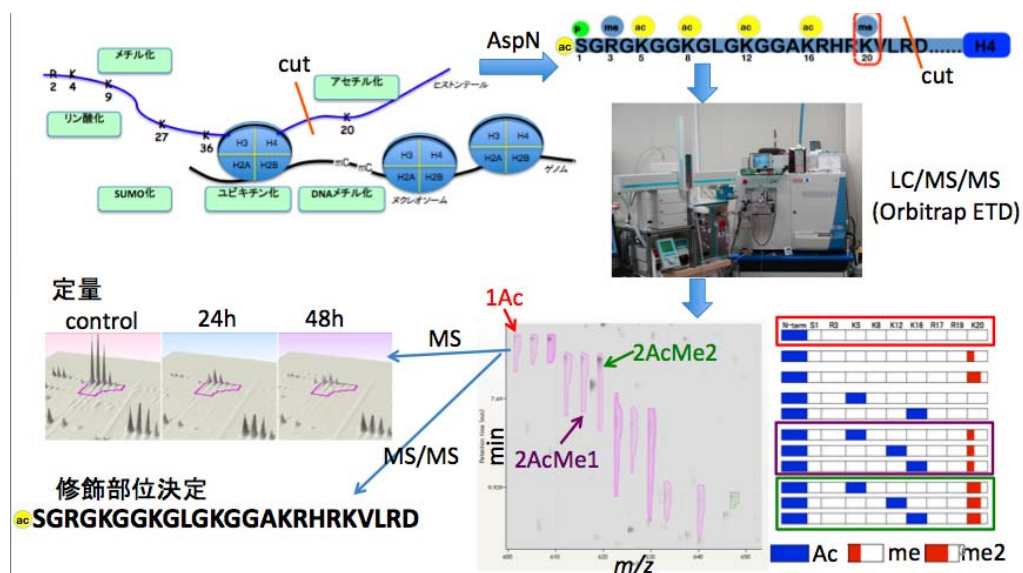


図3 ヒストン H4 テールの解析手法

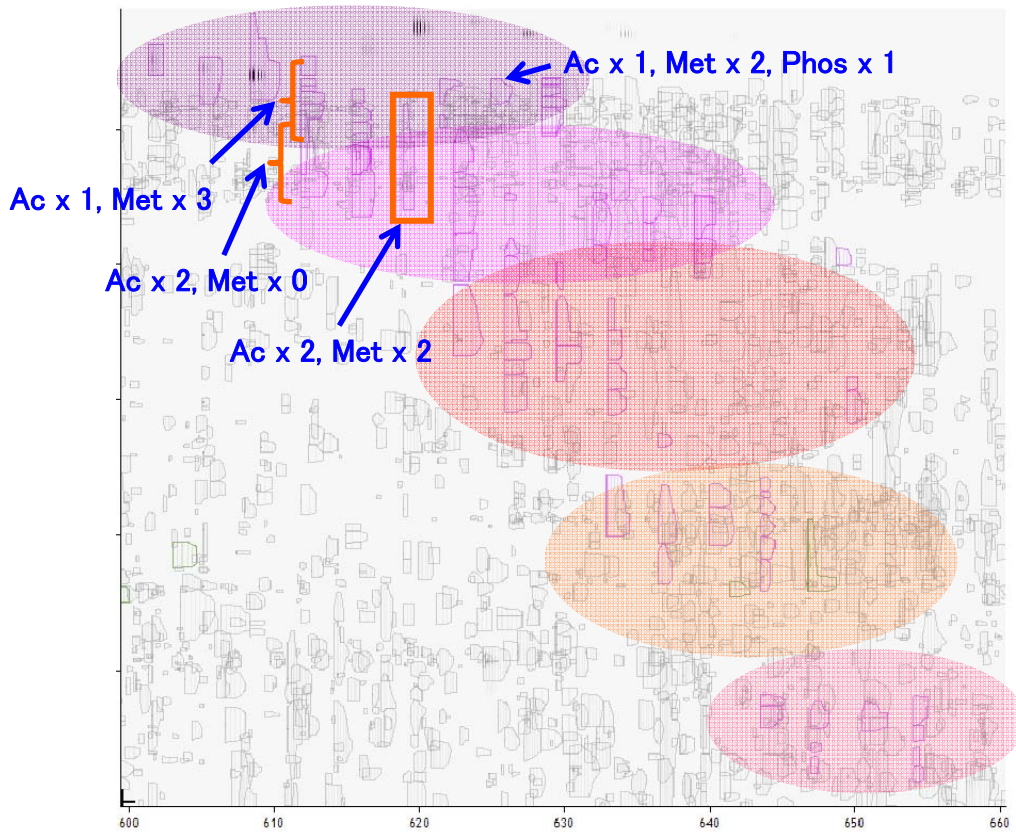


図 4 H4 テールの LC/MS/MS の 2D マップ赤四角で囲んだ物が H4 テールの 1 修飾パターン

ヒストン修飾の理論的組み合わせは、H4 だけでも 500 種以上ある。高精度・高分解能質量分析計で ETD を用いてもこれらを完璧に識別するのは困難である。そこで今年度よりさらに高分解能の MS での解析を行い、これまで LC 分離しなければ分別不能だったトリメチル基とアセチル基を MS だけで分離出来るようになった (図 5)。その結果より多くの修飾パターンを検出している。

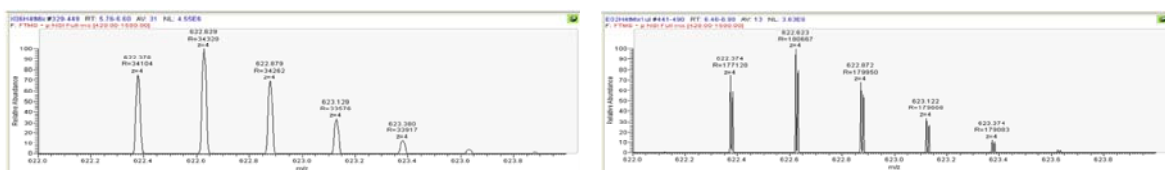


図 5 H4 テールのトリメチルとアセチル基のみの違いのペプチド混合物の測定 (左 : 分解能 60,000、右 : 分解能 240,000。分解能 240,000 の設定で 2 者の 0.036Da の差異を MS のみで分離できた。)

LC 分離についても通常用いられる逆相カラムと特性の異なる親水性相互作用を利用した Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) の検討をモデルタンパクで行い、保持を逆転させることで親水性の高いペプチドの保持を高くできた (図 6)。現在ヒストン解析に使用するための高感度化の条件検討を行っている。

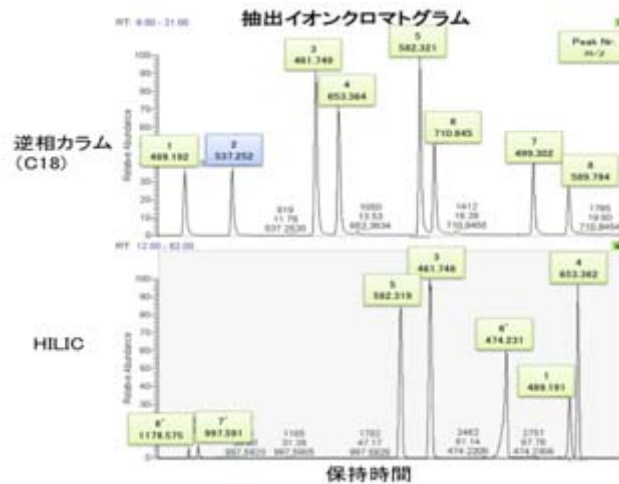


図6 HILICと逆相カラム
(HILICでは逆相カラムで最初に溶出されるペプチド1が2番目に強く保持されている。)

現在同様の手法を用いて、H3 テールコードのダイレクト質量分析解析法の開発を行っており主要な修飾である H3K4 と H3K9 は 1 フラグメント上で検出出来るようになった (図7)。

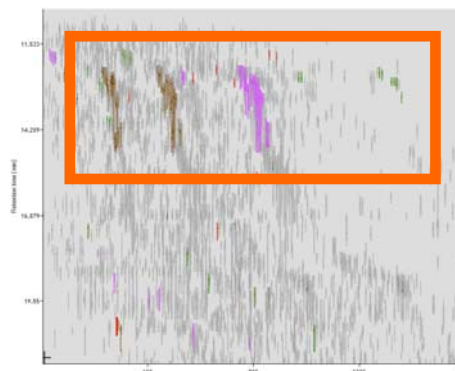
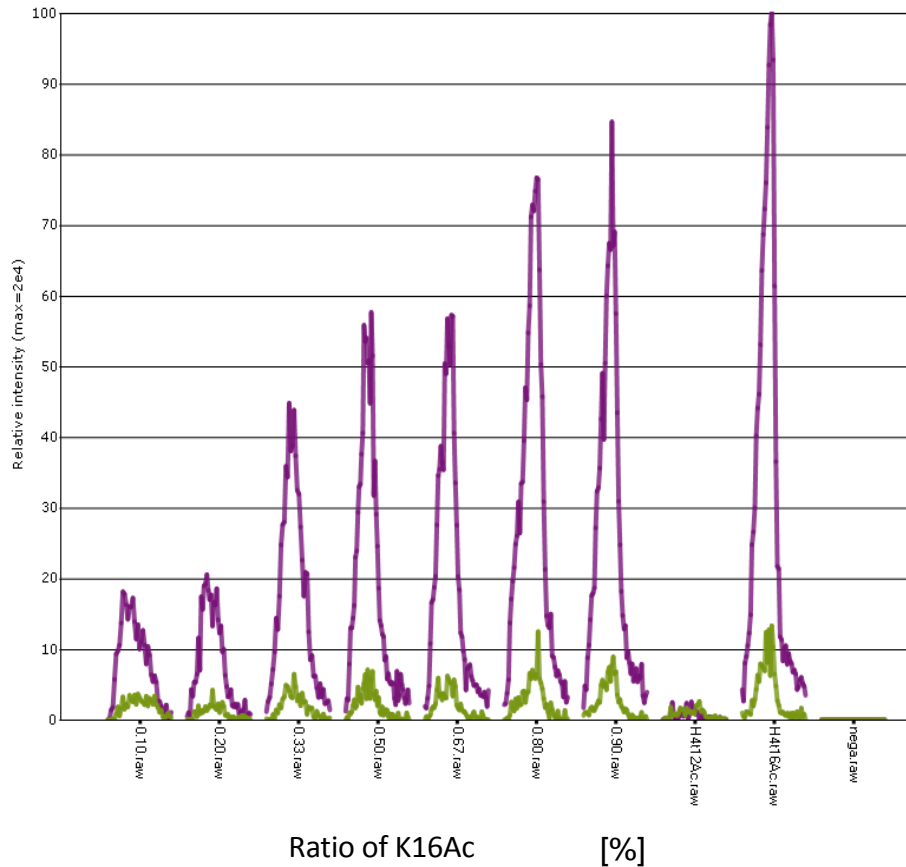


図7 H3 テールの解析
(枠内の色を付けた部分が H3K4, K9 を含む部分の H3 テールの修飾組み合わせパターン。)

さらに特定の修飾組み合わせをハイスループットに定量するために安定同位体ラベルペプチドを内部標準とした三連四重極質量分析計 (Triple Q-MS) による選択的反応モニタリング (Selected reaction monitoring: SRM) での定量技術の開発に着手した。SRM を ETD で行える MS は現存しないため ETD で得た情報を基に、合成ペプチドを用いた CID での SRM の条件を検討した。これまでにアセチル化部位だけが異なる 4 種の同一質量のペプチドから特定の修飾パターンを持つ物だけを定量的に検出することに成功している (図8)。現在さらに高精度、高感度化の検討と、安定同位体ラベルペプチドを用いた絶対定量の検討をおこなっている。



**図8 K16Acの比率を変えた4種のペプチドのSRM定量結果
(混合比率に対応した定量結果が得られている。)**

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

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

高速・高分解能質量分析計 orbitrap ELITE の導入と解析技術の向上によりヒストン H4 テール以外にも H2A/2B, H3 の一部のテールも検出できるようになった (図 9,10)。

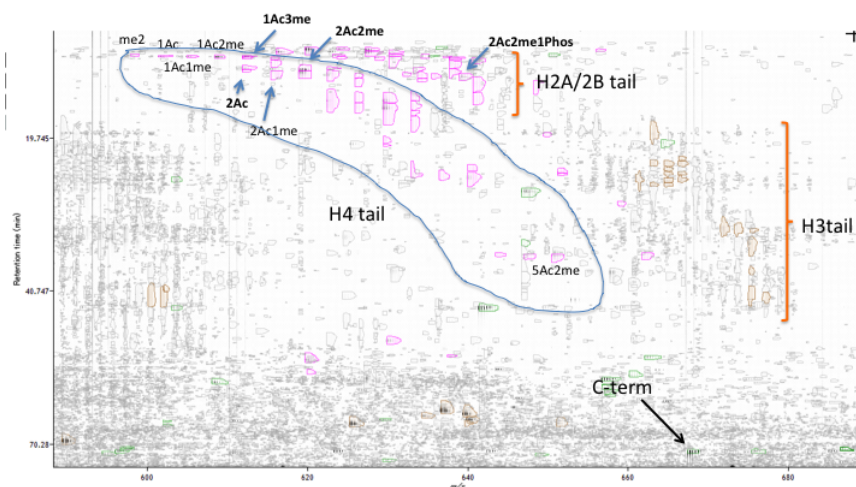


図 9 精製ヒストンの LC-MS データの 2 次元マップ

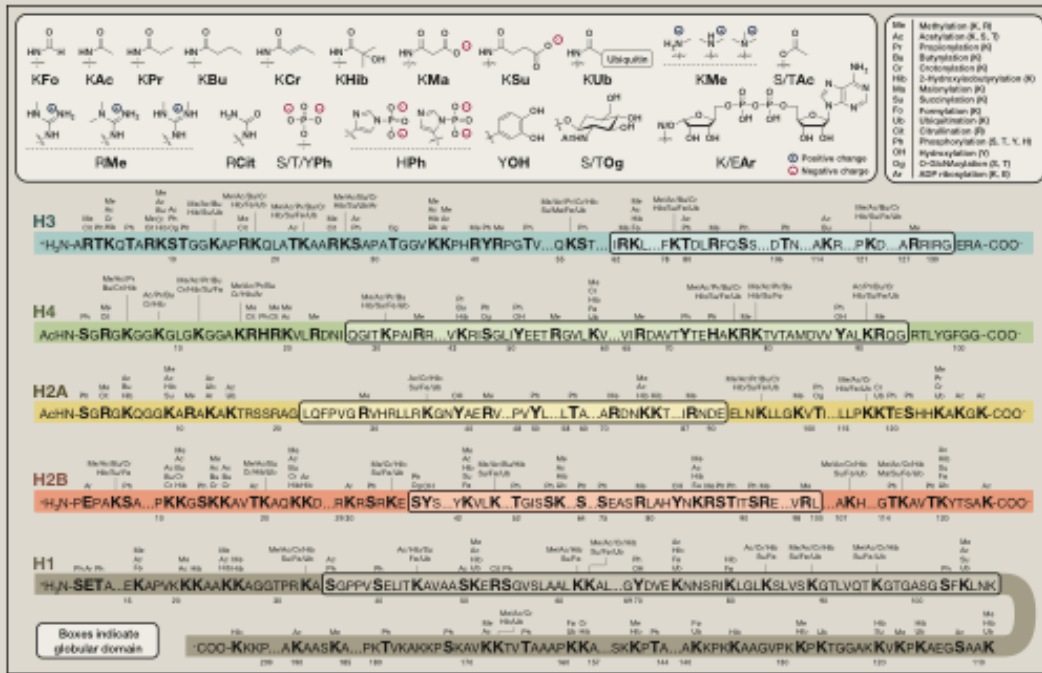
Sequence	Modifications	Delta PPM	Prob
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Methyl (+14), Methyl (+14)	-0.90	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Methyl (+14), Methyl (+14), Acetyl (+42)	-0.62	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Methyl (+14), Acetyl (+42), Deamidated (+1), Dimethyl (+28)	-4.7	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Methyl (+14), Acetyl (+42), Dimethyl (+28)	-0.81	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Deamidated (+1), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Acetyl (+42)	-4.3	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Methyl (+14), Acetyl (+42)	-0.18	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Dimethyl (+28)	-7.0	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Dimethyl (+28)	-7.0	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Methyl (+14), Acetyl (+42)	-0.18	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Methyl (+14), Trimethyl (+42)	-7.0	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Dimethyl (+28)	-0.82	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Acetyl (+42)	-0.82	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Trimethyl (+42), Acetyl (+42), Methyl (+14)	-0.82	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Methyl (+14), Acetyl (+42), Trimethyl (+42), Acetyl (+42)	-0.72	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Acetyl (+42)	-0.72	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Acetyl (+42), Acetyl (+42)	-6.1	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Acetyl (+42), Acetyl (+42)	-6.1	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Acetyl (+42), Acetyl (+42)	-6.1	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Trimethyl (+42)	-1.5	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Acetyl (+42), Trimethyl (+42)	-1.5	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Acetyl (+42), Trimethyl (+42), Dimethyl (+28)	-1.5	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Dimethyl (+28), Trimethyl (+42), Acetyl (+42)	-1.5	95%
(-)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKVARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVLR(E)	Acetyl (+42), Trimethyl (+42), Acetyl (+42), Dimethyl (+28)	-1.5	95%

図 10 データベース検索によりヒットしたヒストン H3 の修飾組み合わせ候補

しかしながらここ数年で新規ヒストン修飾が次々と報告されヒストンテールの修飾組み合わせは H4 だけでも理論組み合わせで 4,500 万通りと膨大な理論組み合わせになりそれらの修飾位置を正確に同定するのは極めて困難になってきた (図 11)。修飾部位を正確に同定するためにはペプチドの質量を決定するための高分解能の MS だけでなく、修飾部位を決定するための MS/MS も高分解能である必要が生じてきた。

SnapShot: Histone Modifications

He Huang,¹ Benjamin R. Sabari,² Benjamin A. Garcia,³ C. David Allis,² and Yingming Zhao¹
¹Ben May Department of Cancer Research, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA
²Laboratory of Chromatin Biology and Epigenetics, The Rockefeller University, New York, NY 10021, USA
³Department of Biochemistry and Biophysics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA



Cell 159, October 9, 2014

図 11 最新のヒストン修飾情報

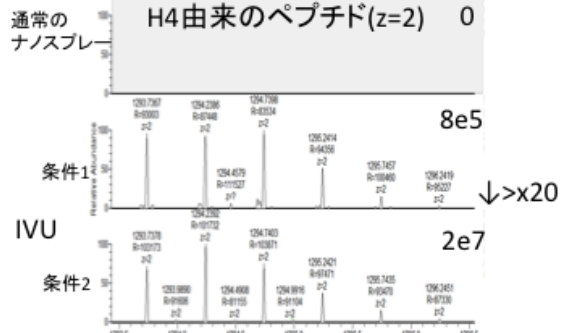
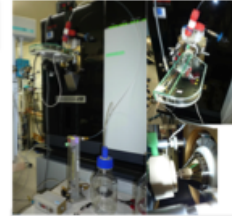
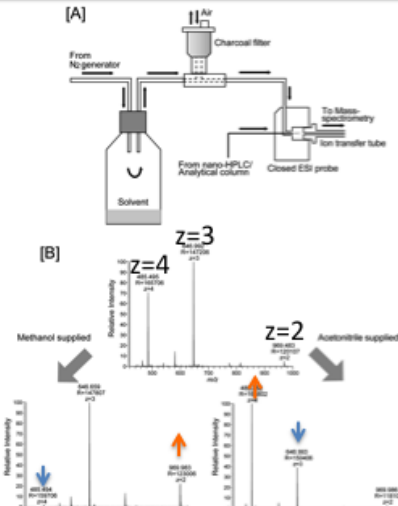
従来の orbitrap では MS/MS を高分解能にするとデータ取得速度と感度が落ちるため網羅的な修飾解析が出来なくなる。そこで高速・高分解能の MS/MS が可能で測定質量範囲も広く約 50 アミノ酸の H3 テールの解析も適しており、Orbitrap ELITE より高分解能で従来の orbitrap にさらに四重極 MS を追加し高感度化した次世代質量分析計 Orbitrap Fusion を導入した。これにより ELITE にくらべタンパク質同定数が向上した。さらに Fusion 用にプロトン付加数を制御する閉鎖型イオン源を開発した(図 11)。これを用いることで H4 テールについては CID での解析も可能な 2 価イオンを生成させることを可能にした。さらにこのデバイスではバックグラウンドノイズの低減と、親水性ペプチドのイオン化効率を向上させるためこれまで検出出来なかった 6 価のヒストン H3 テールを高感度に検出することに成功し、S/N ベースでこれまでの手法に比べ 100 倍以上ヒストンテールの検出能を高感度化した(図 12)。

オービトラップFusionによるタンパク同定数

Orbitrap ELITE 23 1542 342 Orbitrap FUSION



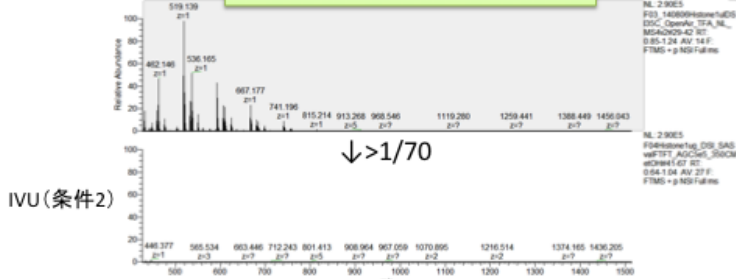
イオン化時のプロトン付加数制御法(IVU)の開発



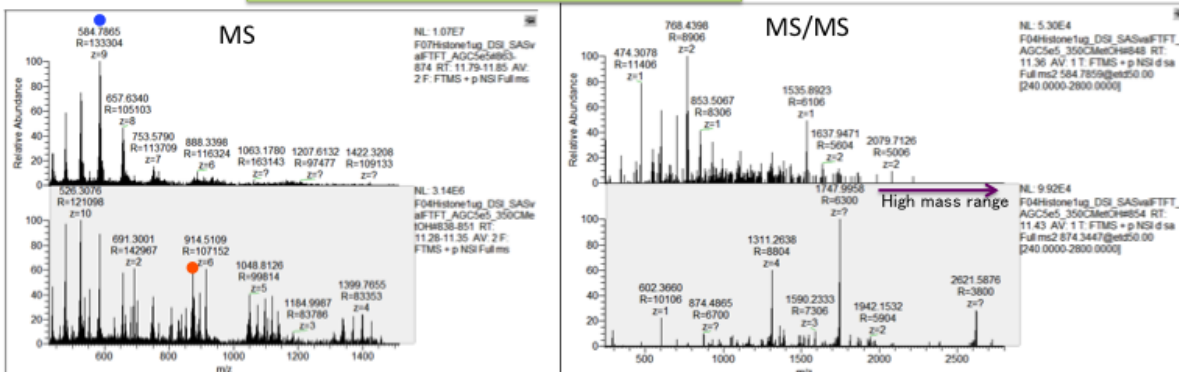
ヒストンテールのプロトン付加数制御とイオン化効率を高めるデバイスの開発を行い、通常では検出されない2価イオンを生成させた。同時にバックグラウンドノイズを1/50以下にした。

図 11 プロトン付加数制御により価数変換と高感度化

バックグラウンドノイズの低減



電価数制御によるH3テール検出の向上



バックグラウンドノイズの低減によるピーク検出能の向上と高感度化によりH3テールの検出能をS/Nベースで100倍以上にし、チャージシフトにより、同定精度の向上が期待される6価イオンの解析を可能にした。

図 12 Orbitrap Fusionによる H3 テール検出能の向上

しかしながら Fusion ではこれまでと ETD の構造が大きく変わったためか ETD でのフラグメント効率が極端に落ち、ヒストン由来ペプチドの MS/MS フラグメントがほとんど観察されなくなった。装置メーカーと共同で改良を行うことでフラグメントイオンが検出されるようになり本来の目的に使用出来る質の高分解能 MS/MS データが取得出来、現在最適化を行っている(図 13)。

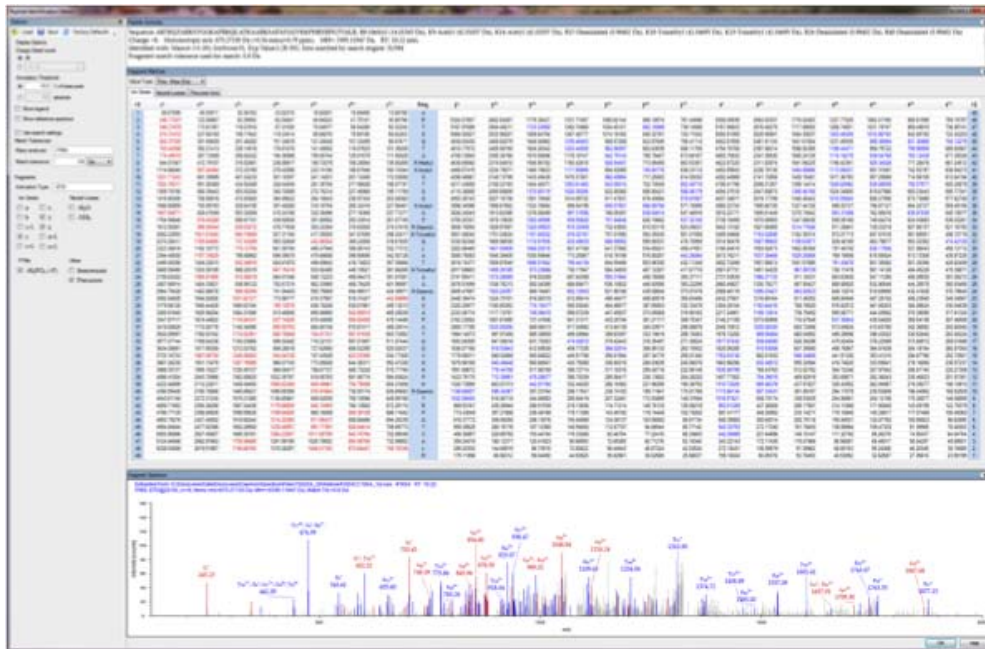


図 13 Orbitrap Fusion で取得した高分解能 MS/MS によるヒストン H3 テールのフラグメント

Orbitrap Fusion のデータを用い修飾部位を解析するために解析ソフトウェアの開発も行った(図 14)。既存のプロテオーム用のタンパク質同定のためのデータベース検索エンジンは擬陽性を防ぐためと検索時間の短縮のために設定修飾数が制限されている。また設定可能な場合でも膨大に増えたヒストン修飾パターンを検索するには計算力が不足する。そのため対象とするヒストンのファミリーを絞って検索を行うことで、図 11 に示したヒストンの既存の翻訳後修飾を全てと新規な修飾も検出

出来るような機能をもちながら、ワークステーションレベルのコンピューターで修飾部位を決定できるようにソフトウェアを開発中である。現在これを用い修飾部位の正確な決定、ソフトウェアの改良を進めており将来的には同定の自動化を目標としている。

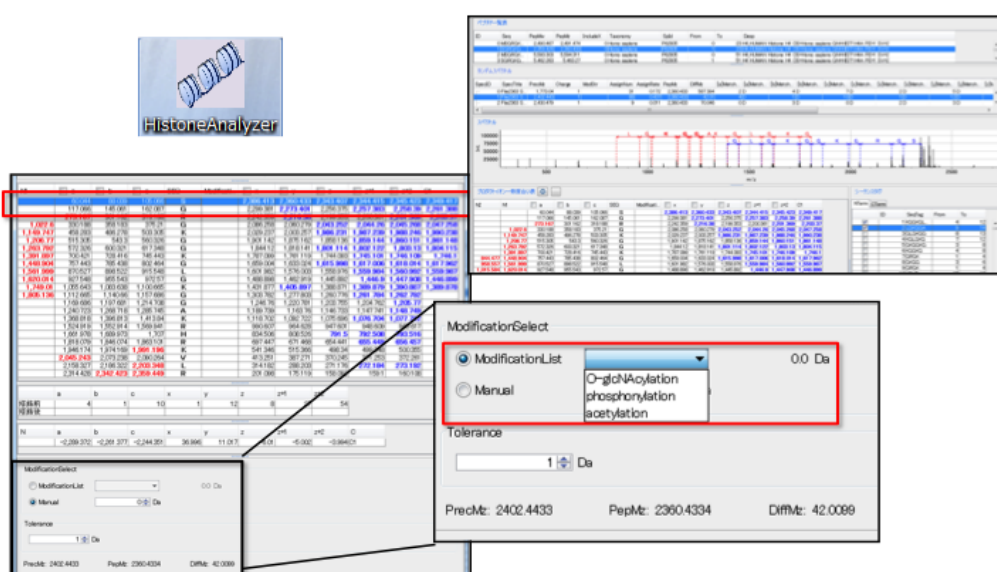


図 14 ヒストン修飾組み合わせ解析に特化した解析支援ソフトウェア

また ETD は約 20-50 アミノ酸の比較的長いヒストンテールの翻訳後修飾解析に適した手法であるが側鎖のフラグメント化が起こらないためヒストンの重要な修飾の一つアルギニンの対称ジメチル化と非対称ジメチル化の判別が付かない。それを決定するために nanoLC と高分解能 MALDI-TOFMS を組合わせた手法により対称・非対称ジメチルアルギニンを含むヒストン H4 テールペプチドの定量法を開発した(図 15)。この手法を用いて現在細胞周期で変動するジメチルアルギニンの対称・非対称の識別を行っている。

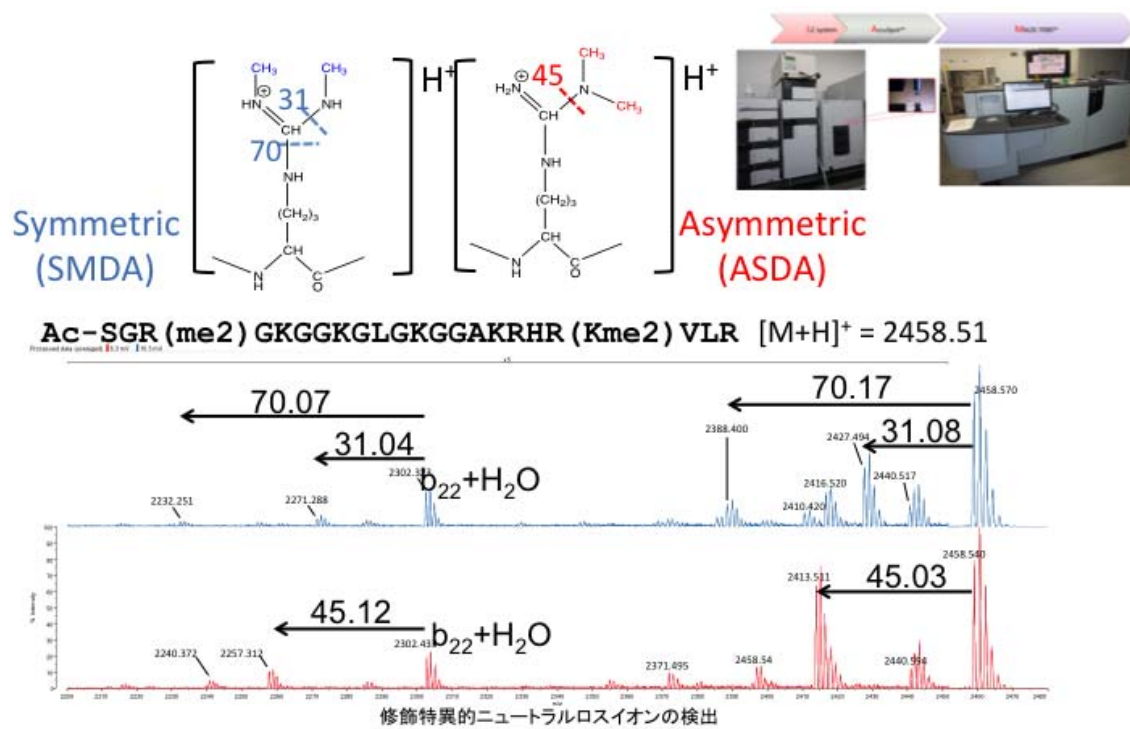
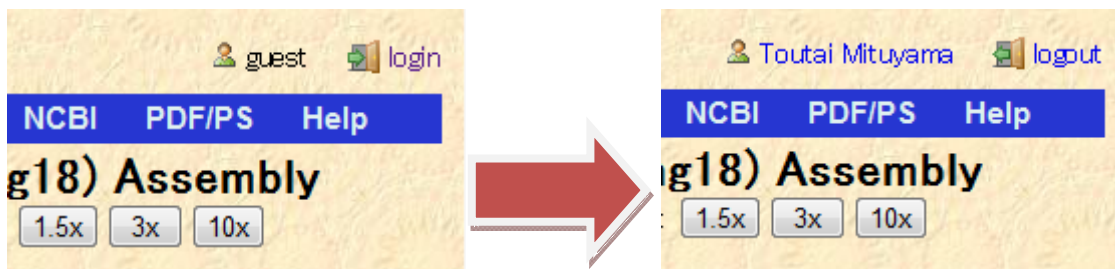


図 15 高分解能 MALDI-TOF MS による対称・非対称ジメチルアルギニンの識別

(2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発

① エピゲノムデータベースの構築

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



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

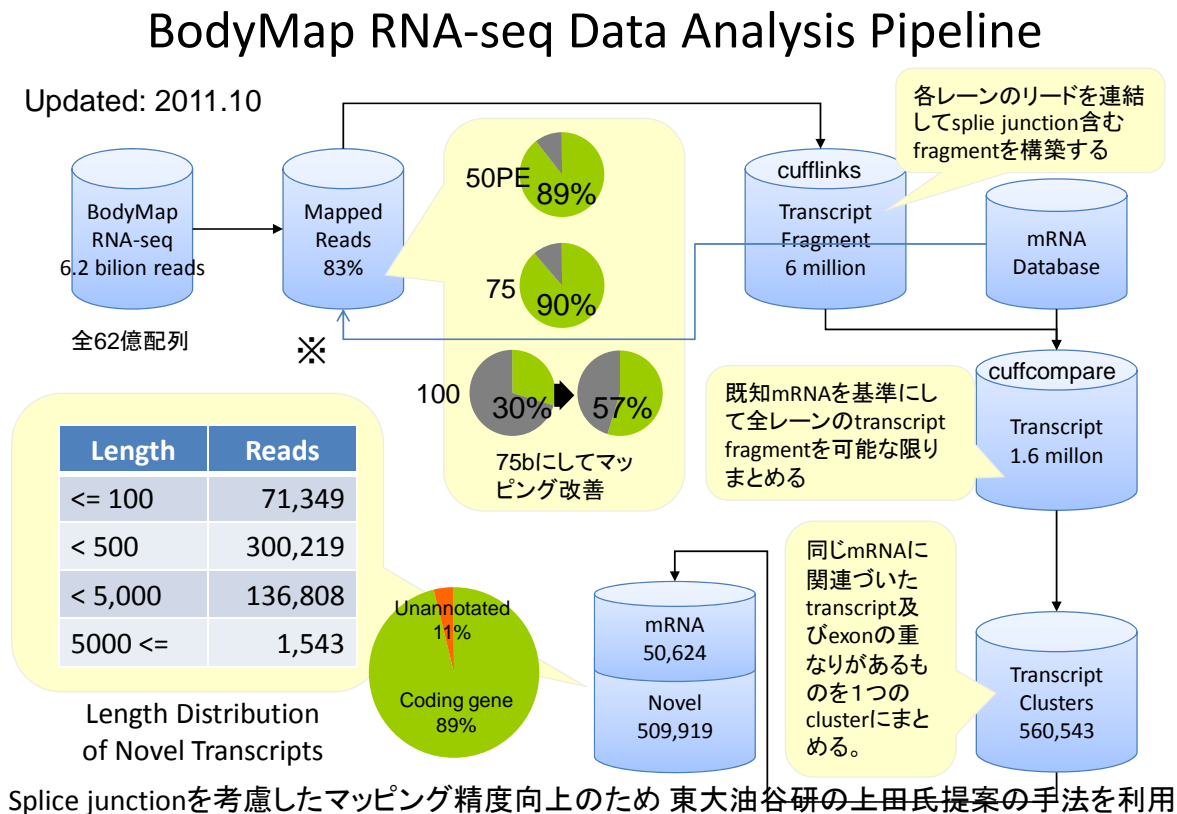
表 独自に追加したトラック情報

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

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

② 新規 lincRNA 候補の情報学的抽出

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

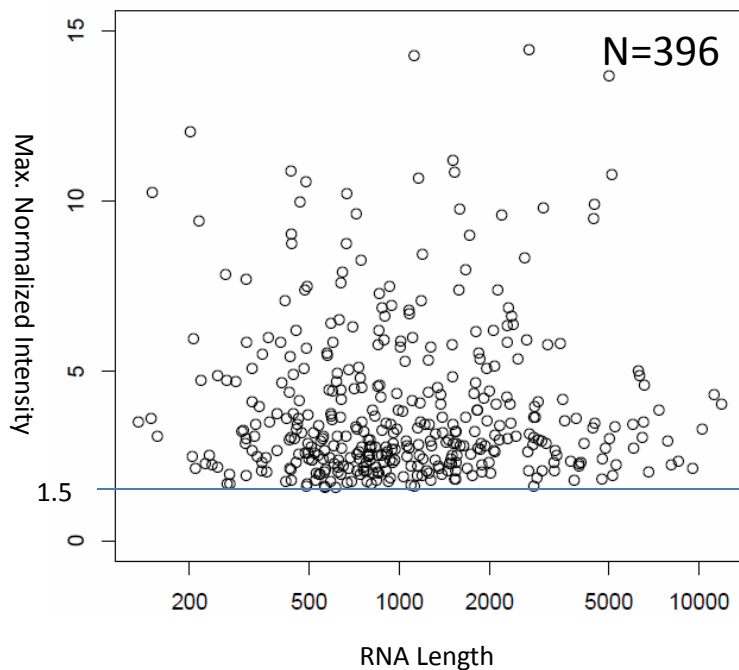


上記のパイプラインによって、既知の lincRNA (long intergenic noncoding RNA) と重複する候補が 2,574 個、新規のもので既知の mRNA でも重複して観測されているものが 66,108 個、まったく新規に得られたものが 109,974 個得られた。これらの中で、150 塩基以上の長さで、発現量の高いもの (Z スコア 1.5 以上) を選別すると、396 個が得られた (下図)。

③ エピゲノム情報パイプラインの構築

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

Novel Transcripts (long and high intensity)



④ DNA メチル化領域検出のための高精度情報処理パイプラインの構築

DNA メチル化の網羅的解析のための、高精度な bisulfite-seq 情報解析パイプライン「Bisulfighter」を開発した。既存の類似手法と比較してもっとも高精度であることがベンチマーク結果から示された。情報ツールは次の URL にて公開している。 <http://epigenome.cbrc.jp/bisulfighter/>

DNAメチル化領域検出のための高精度情報処理パイプラインの構築

齊藤・辻・光山

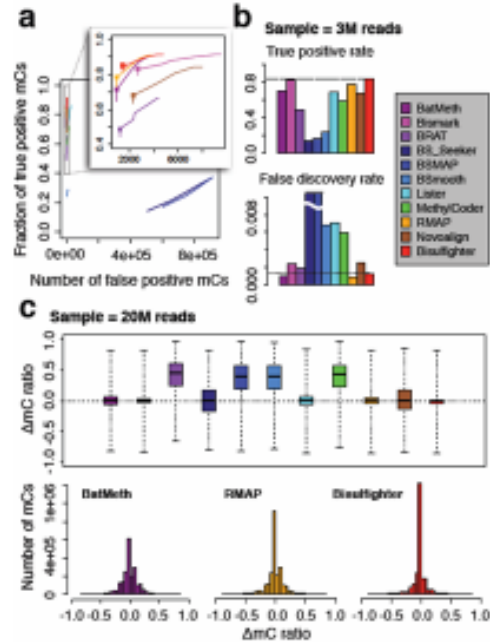
【研究成果の概要】

•DNAメチル化領域の検出は、遺伝子の発現制御に関連しており、細胞のガン化や多能性獲得の重要なカギと考えられています。検出には次世代シーケンサによる大量配列解析を用いるので、配列情報処理技術が不可欠です。我々は、生命情報工学研究センターが開発した配列アライメントプログラムLASTを応用することで、従来法よりも高い精度でDNAメチル化領域を検出することができる情報処理パイプラインを構築することに成功しました。

【開発技術の用途】

- DNAメチル化領域の検出
- DNAメチル化検出アレイプローブの開発

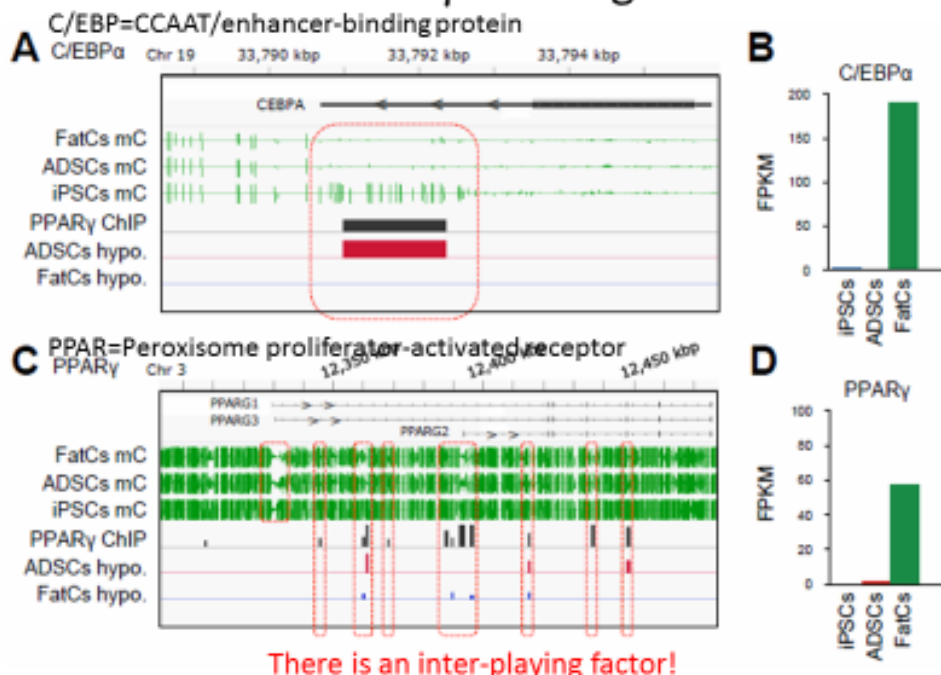
右図 開発パイプラインの検出性能特性
「True Positive Rate」は検出感度の良さを示し（高いほど良い）、「False Positive Rate」は同調性（顕陽性）易さを示す（低いほど良い）。



⑤ 脂肪細胞の組織特異的メチル化変化領域の情報解析

④の成果を利用して、脂肪細胞分化過程におけるDNAメチル化変化を調べたところ、微小なDNAメチル化変化領域の存在を発見した。この微小なDNAメチル化変化領域は、脂肪細胞特異的に発現する転写因子であるPPAR γ の結合部位であることを示すChIP-seqの結果と一致することが、わ

FatC Markers: C/EBP α and PPAR γ and PPAR γ -binding sites



There is an inter-playing factor!

かった。一方、この領域に PPAR γ が結合していないときには、対応する遺伝子の発現がみられないことから、DNA の脱メチル化が即遺伝子の発現に結びつかないことがわかり、遺伝子転写制御における、DNA メチル化と転写因子および遺伝子の発現の新しい関係を見出すことができた。

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

(1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

① 臨床検体の収集と病理解析

新鮮凍結検体の収集を基本として、長鎖 RNA を含めたエピゲノム解析に耐える品質管理の下に、胃癌、肺癌、肝臓癌について 200 例程度の症例の蓄積を行い、また同時に腫瘍組織から体系的に DNA・RNA の抽出・精製を行った。また高悪性度、難治性腫瘍に対する新規の標的探索という目的に鑑み、肺及び肝臓に関しては、転移、再発を含めたすべての腫瘍性病変のバンキングを行っている。関連する臨床病理学的な情報の整理も行っている。胃癌、肺癌、肝癌以外の 15 種の臓器由来の腫瘍についてプロジェクトでターゲットとなり得る癌特異的タンパク、核酸の発現評価を迅速に行うための組織アレイの構築を行った。また組織アレイを用いて修飾ヒストンの正常組織における分布、腫瘍特異的発現の検索を行い、複数の修飾ヒストンについて疾患の悪性度との関連を認めた。

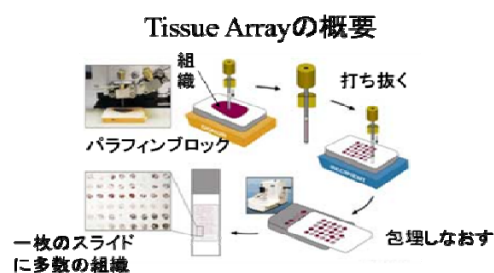
(1) 再発、転移を含めた経時的組織バンキング体制の確立

東京大学附属病院胃食道外科、肝胆膵移植外科、呼吸器外科と連携を取り、臨床情報、病理報告書とも連結可能な状態でバンキングを行った。いずれも、新鮮凍結検体の収集を基本として、長鎖 RNA を含めた解析に耐える品質管理の下に、すでに胃癌、肺癌、肝臓癌について腫瘍部と非腫瘍部について 200 例程度の症例の蓄積を行った。事業終了後も事業で得たノウハウを活用して新規症例を継続的に症例の蓄積を行っていく予定である。従来腫瘍組織バンキングは、各臓器の原発腫瘍が多く、比較的低悪性度の腫瘍に偏る傾向があったが、これまでの治療では十分に治癒の見込めなかった、高悪性度、難治性腫瘍に対する新規の標的探索という目的に鑑み、腫瘍の転移が高頻度に見られる肺及び肝臓に関しては、転移、再発を含めたすべての腫瘍性病変のバンキングを行っている。

胃癌、肺癌、肝癌、胆膵癌を中心に、200 例程度の凍結腫瘍組織から体系的に DNA、RNA の抽出・精製を行った。それぞれについて核酸の精製度・性状・長鎖 RNA の存在を確認するとともに、組織切片の病理学的評価を行って個別に腫瘍含量、組織型の評価を行っている。採取検体の臨床病理学的な情報の整理を行い、本プロジェクトで得られる様々なエピゲノム修飾情報との対応付けが可能な状態とした。品質等の情報は検体採取のプロトコールヘフィードバックを行い、得られた核酸は主に東大先端研の集中研グループにおける研究開発項目②に用いていた。

(2) 組織アレイを用いたタンパク、核酸の評価系の構築

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



胃癌における組織アレイの作製例



<http://medicine.yale.edu/pathology/> より改変

研究期間中に正常臓器（肺・肝臓・腎臓・脾臓・胃・大腸・扁桃・脳・平滑筋・胎盤・羊膜）及び15種類の臓器における腫瘍組織（脳、頭頸部、肺、乳腺、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、大腸、腎臓、膀胱、精巣、前立腺、子宮、卵巣）及び対応する非腫瘍部組織について組織アレイを作成した。構築した組織アレイはタンパク、核酸の評価、及び整理された臨床病理学情報を用いてエピゲノムの標的となるサブグループを特定する用途に用いた。下記に記すように(3)に示すように肝癌でのヒストン修飾によって予後が異なるサブグループに分かれること、ヒストン修飾酵素の発現の有無により尿路上皮癌の予後が別れることを見いだした。

(3) 組織アレイを用いたエピゲノム標的のサブグループの特定

大阪大学木村グループ（研究開発項目①-（1）-③修飾ヒストン抗体パネルの開発）より供与された25種の修飾ヒストンのモノクローナル抗体を用いて、正常諸臓器（肺・肝臓・腎臓・脾臓・胃・大腸・扁桃・脳・平滑筋・胎盤・羊膜）と腫瘍組織におけるタンパク質の発現と局在を検索した。正常組織を用いた検討では、ヒストン修飾抗体25種類（22修飾部位）のうち、22種類（20修飾部位）が、パラフィン切片にて核にコントラストの良い染色性を示した。臓器によって陽性率に差が見られる修飾とどの臓器でもび漫性に陽性を示す修飾が見られた。H3K9ac、H3S10ph、H3K27me3、H3S28ph、H4K12acなどは臓器によって陽性率に差が見られ、特にH3S10phは、肺、胃、大腸、扁桃、平滑筋、胎盤などでは、一部に陽性を示したが、肝臓や脳では陰性であった。扁桃リンパ節では、胚中心、マントル、濾胞間でヒストン修飾の状態が異なっていた。また、各種癌（食道癌3例、胃癌3例、大腸癌3例、肺癌3例、肝細胞癌3例、膵癌3例、甲状腺癌3例）を用いたパイロット的検討において、食道癌と肝細胞癌では、一部抗体で食道と肝臓に癌部・非癌部に染色性の差が見られた（図1）。肝癌では198例について、ヒストンH3K27acとH3K27me3の状態を抗体を用いて評価したところ背景肝に比較して肝癌において有意に染色性があがり（図2）、肝癌のなかでも低分化組織型、P53陽性像、不良予後と有意に相関することが分かり、ヒストンH3K27acとH3K27me3の状態が高悪性度群のマーカーとなりうることが判明した。またヒストンメチル化酵素であるEZH2については171例の尿路上皮癌を対象とした免疫染色による検討では94例が高発現し、高組織グレード・リンパ管侵襲・高ステージなどの予後不良因子と相関することが判明した。また実際にサバイバルとの有意な相関を示し予後のバイオマーカーとなることが判明した（図3）。

(4) がんの Xenograft 組織の解析

ゼノグラフト状態では通常の培養細胞と異なり、がん細胞と低酸素、炎症、血管支配などの周囲環境との相互作用が見られる。これらの相互作用による生体に近いがんのプロファイルが、がんに対する創薬ターゲットのバリデーションに重要なだけでなく、周囲環境を構成する血管内皮、炎症細胞、線維芽細胞における創薬ターゲットの同定につながる可能性がある。パイロット的に胃癌及び膵癌のゼノグラフト組織よりRNAを抽出しトランスクリプトームシーケンシングを行った。配列によりヒトトランスクリプトと、マウストランスクリプトに分離し癌細胞と間質細胞の発現プロファイルを別個に行った。その結果がん細胞からの液性因子等により血管新生等の間質反応が起こり、逆に間質由来のタンパクが癌細胞にシグナルをいれる全体像が明らかとなった。これらのいくつかでは実際の臨床組織においても癌特異的発現、間質特異的発現などがタンパクレベルでも確認できた。事業終了後もこれらのノウハウを活用して事業内で作成したゼノグラフトの詳細な解析等に生かせると考えられる。

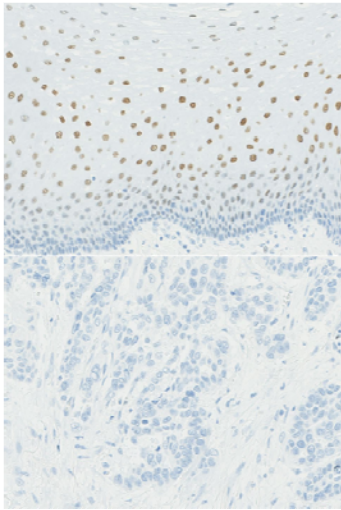


図1 特定の修飾ヒストンに対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色の結果の例。食道粘膜正常部（上）に対し、食道癌部（下）は発現が消失していることがわかる。

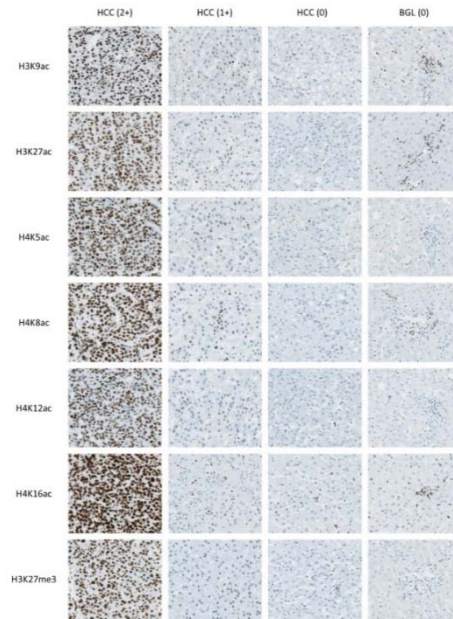


図2 肝癌に対する多様な修飾ヒストン抗体に対する免疫染色結果の例。肝癌も、症例間や、同一症例でもその部位によって染色性が異なる。一部では組織型や予後との相関が認められた。

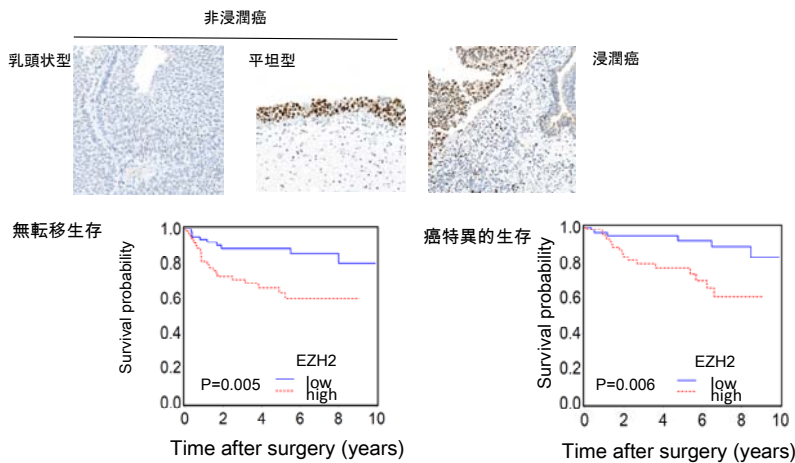


図3 尿路上皮癌における EZH2 の発現と予後との相関
非浸潤性の乳頭状尿路上皮癌は EZH2 の低発現を示すものが多く見られたが、非浸潤性の平坦型尿路上皮癌や浸潤癌は EZH2 を高発現していた。EZH2 の高発現群は、無転移生存、癌特異的生存とも予後不良であった。

② Xenograft パネルの研究開発

ヒトのがんは、患者個人の遺伝子多型や遺伝子変異、生活環境等の違いに起因する多様性を有し、この多様性はがんの最大の特徴の一つであるとともに、有効な治療法開発の大きな障害となっている。したがって、たとえ同一のがん種であっても、できるだけ多くのがん患者由来のがんについて解析することは、ヒトのがんの病態解明 及び 今後の個別化医療に必須である。しかしながら、ヒトがん手術症例から得られる新鮮な検体のみでは採取量に限界があるため、同一症例の手術検体から、病理組織診断に加えて、遺伝子発現解析、遺伝子変異解析、ならびにエピゲノム解析を行い、エピゲノム修飾異常と疾患とを関連づけ、新たな創薬・診断の標的候補分子の同定を行うことは極めて困難である。そこで、患者の手術検体から得られる新鮮ながん組織を用いて、生体内のヒトがん組織の性質を最も忠実に再現可能なヒトがん検体の直接移植による「PDX (patient-derived xenograft)」や「培養細胞株」を樹立して活用することは、本プロジェクトの目的である疾患発症に関わるエピゲノム修飾異常を引き起こす原因分子の探索と検証に有用と思われる。

特に、早期診断が困難な難治性がんである「膵がん」や、「日本人に多い胃がん 中でも スキルス型胃がん」などは、臨床上有用な新規バイオマーカーの発見の意義は大きい。これらのがんは間質成分が豊富で、がん組織に占めるがん細胞の割合は少ないため、切除組織から直接がん組織を解析することは極めて困難であり、レーザーマイクロダイセクション等を用いてがん細胞を精製・濃縮する必要がある。そのため手術検体試料を用いた解析には、常に量的制限が付きまとう。そこで、これらのがん種を PDX 化することができれば、繰り返し利用可能な標準化されたサンプル供給が可能となり、再現性や信頼性の高い解析精度の向上した結果をもたらし、本プロジェクトに十分に貢献することが期待できる。

本プロジェクトにおけるがん研究会の分担担当の研究計画は、1)膵がん 及び 胃がんに関して、同一患者のがんと正常組織の比較解析を行うため、腫瘍 及び 対照正常組織をペアとした臨床検体を年間20症例収集すること、2) 収集した新鮮な腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植し、年間5ラインの PDX を作製すること、である。したがって、トータル5年のプロジェクト期間内に、膵がん 及び 胃がん、それぞれ100症例以上の腫瘍 及び 対照正常組織をペアとした臨床検体収集と、それぞれ25ライン以上の PDX 作製を目標とした。

1) 腫瘍 及び 対照正常組織をペアとした臨床検体の収集と PDX の作製

膵がん 及び 胃がんの腫瘍 及び 対照正常組織をペアとした臨床検体の収集 ならびに PDX の作製は、手術での病理組織診断後の新鮮な余剰検体からおこなった。収集・凍結保存できた全ての検体には「後天的ゲノム情報と疾患との関連の解明」に重要となる詳細な臨床情報が付随している。

本プロジェクト期間内に収集した腫瘍 及び 対照正常組織をペアとした臨床検体数、ならびに、樹立に成功した PDX ライン数を、「表1」にまとめた。なお、収集した臨床検体には原発巣以外に、リンパ節転移や肝転移の症例も含まれている。

表1 膵がん及び胃がんの年度別収集検体数と作製したPDXライン数

がん種	年度	累積移植 症例数	PDX 累積樹立数	PDX 成功率 (%)	腫瘍・正常組織を ペアとして収集した 累積検体数
膵がん	H22	20	5	25	20
	H23	71 (+51)	11 (+6)	15	71 (+51)
	H24	123 (+52)	19 (+8)	15	123 (+52)
	H25	148 (+25)	26 (+7)	18	148 (+25)
	H26	(前年度までに当初計画の目標数達成のためH25年度で終了)			
胃がん	H22	25	5	20	25
	H23	79 (+54)	10 (+5)	13	79 (+54)
	H24	127 (+48)	16 (+6)	13	127 (+48)
	H25	177 (+50)	24 (+8)	14	177 (+50)
	H26	208 (+31)	30 (+6)	14	208 (+31)

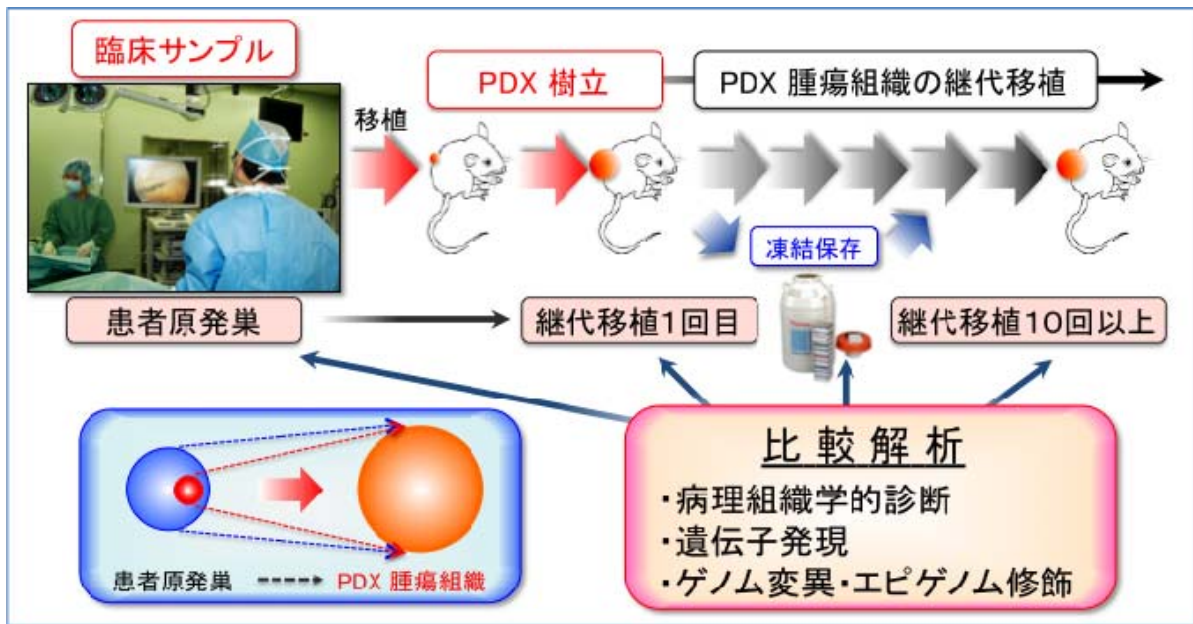
研究計画は毎年見直して新たに設定し、「膵がん 及び 胃がん、それぞれ新たに20症例の臨床検体の収集と、それぞれ5ラインのPDX樹立」を目標とした。ただし、膵がんは、H25年度までに当初の計画目標数以上を達成したためH25年度で終了し、平成26年度は胃がんのみ継続しておこなった。5年間のプロジェクト終了までに、「膵がんの収集検体数は148、PDXライン数は26（成功率18%）」で、一方、「胃がんは208検体、30ライン（成功率14%）」であった。したがって、膵がん 及び 胃がんともに、それぞれ年間20ペアの臨床検体を収集し、5ラインのPDXを樹立するという、当初の研究計画を上回る成果であった。

収集した臨床検体の腫瘍組織を用いたPDXの作製は、最大5mm角の腫瘍組織片を免疫不全マウスであるNudeあるいはNOD/SCIDマウスの背部皮下の3箇所にも異種移植しておこなった。経時的に移植部位の腫瘍形成の有無を観察し、腫瘍形成が認められた症例では、再移植時に腫瘍組織の一部をOCT封入し、遺伝子発現や変異解析用に急速冷凍後凍結保存した。また腫瘍組織の一部は病理標本用にホルマリン固定、さらには再移植用に組織凍結保存液、セルバンカーを用いて凍結保存した。

2) PDXの長期継代移植 及び 凍結保存（融解後の再移植）による組織型（構築）の維持の検証

PDXの腫瘍組織は、多様性に富んだ患者原発巣のほぼ全体から一様に形成してきたのか？（図1）あるいは、マウスへ生着する際、何らかのバイアスがかかり、マウスへ生着し易い あるいは特定の一部の集団が選択されて腫瘍を形成したのか？ 更には、凍結融解後、移植し生着したPDXの腫瘍組織では、更に 何らかのバイアスがかかるのか？ について、病理組織学的解析に加え、遺伝子発現プロファイルの検証をおこなった。

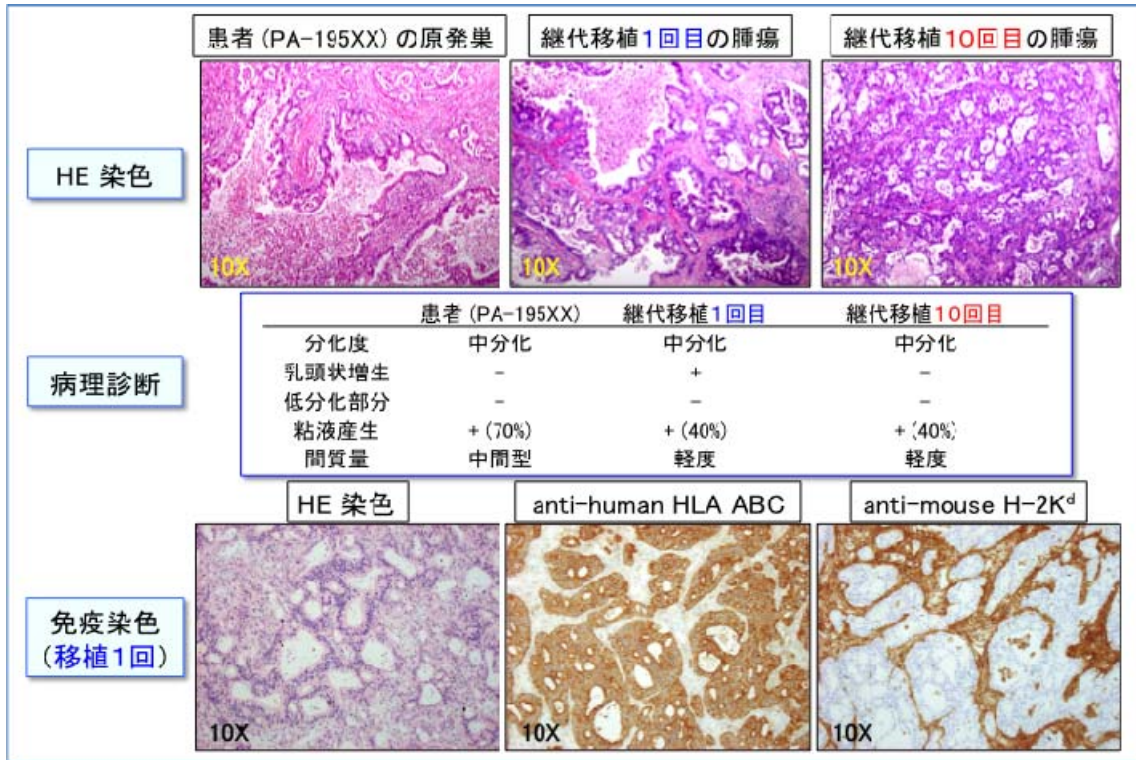
図1 PDX 腫瘍組織の多様性維持の検証



まず始めに、「PDX の腫瘍組織は、継代移植を繰り返し長期継代移植しても 患者原発巣の組織型（構築）を維持しているのか？」について、膵がん 及び 胃がんについて検証した。

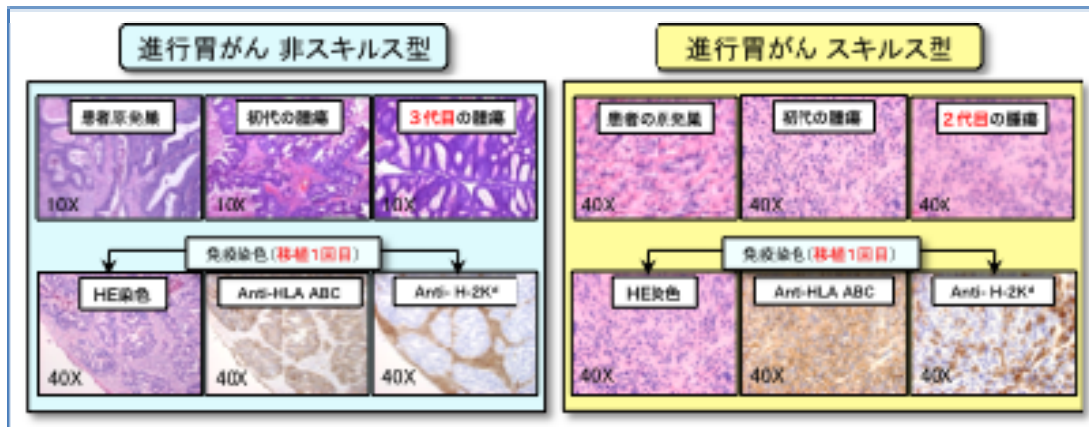
図2の上段は、「膵がん患者 (PA-195XX) の原発巣、PDX ライン Xeno-005XX の継代移植1回目、10回目腫瘍組織の HE 染色による組織標本」で、病理医の診断結果から（図2の中段）、PDX の腫瘍組織は、継代移植を10回目繰り返しても患者の原発巣の腫瘍組織型（構築）の特徴を非常に良く保持し、組織構築が維持されていることが確認された。胃がんの場合でも同様であり、樹立に成功した複数例の膵がん 及び 胃がんの PDX 腫瘍組織標本の病理医による診断の結果から、PDX 腫瘍組織は、継代移植を繰り返しても患者の原発巣の腫瘍の分化度や組織型を極めて良く保持していることが明らかとなった（図2 及び 図3）。これらの結果から、継代移植を繰り返した PDX の腫瘍組織内には、「元々の患者原発巣由来のがん幹細胞」が一定量以上の割合で含まれ、維持されていることが強く示唆される。図2の下段は、PDX ライン、Xeno-005XX の継代移植1回目の腫瘍組織を ヒト 及び マウスの MHC クラス I 抗原に対する抗体を用いて、それぞれ免疫染色した結果を示す。

図2 ヒト膵がん PDX 腫瘍組織の組織型（構築）維持の検証



それぞれの抗体を用いた染色パターンは表裏の関係であったことから、PDX の腫瘍組織の間質は、早い段階からヒトからマウス細胞へ置き換わっていることが明らかとなり、PDX の腫瘍組織が「患者の原発巣の組織型（構築）を保持」し、しかも「継代移植を繰り返しても組織型（構築）が維持されているのは、機能的な間質を含む微小環境が重要な役割を果たしている ことが強く示唆された。

図3 ヒト胃がん PDX 腫瘍組織の組織型（構築）維持の検証



非スキルス型の進行胃がんから樹立された PDX 腫瘍組織のヒト 及び マウスの MHC クラス I 抗原に対する抗体を用いた免疫染色の結果は、膵がんの場合と同様で、継代移植 1 回目の腫瘍組織の各抗体での免疫染色パターンは表裏の関係であったことから、ヒトの間質は早い段階でマウスの間質に置換されていることが明らかとなった (図 3 左)。これらの免疫染色の結果は、「PDX 腫瘍組織が患者原発巣の病理組織像を保持しているのは、組織を支持する間葉系の間質がヒトからマウス細胞へ置き換わり組織型 (構築) が維持されていた」ことを示している。

一方、スキルス型の進行胃がんから樹立された PDX の腫瘍組織は、間質の増生は著しく、ヒトとマウスの抗体による染色パターンは非スキルス型の進行胃がんほど明確ではなかった (図 3 右)。この染色結果は、スキルス型胃がん組織からのがん細胞の精製・濃縮は、レーザーマイクロダイセクション法ではなく、ヒト抗原に対する特異的な抗体を用いたパニング法などの方が効率的であることを示唆している。

次に PDX モデルマウスの腫瘍組織は「薬効評価系に適しているか?」に関して検討をおこなった。図 4 は膵がん PDX モデル、Xeno-6 XX の腫瘍組織を 1 匹のマウスの 3 カ所へ移植し、移植後 8 週目の 5 匹のヌードマウスでの腫瘍形成能と増殖速度をまとめた結果で、比較的安定に生着・増殖している、のが解かる。

図 4 PDX モデルマウスの腫瘍形成能と増殖速度

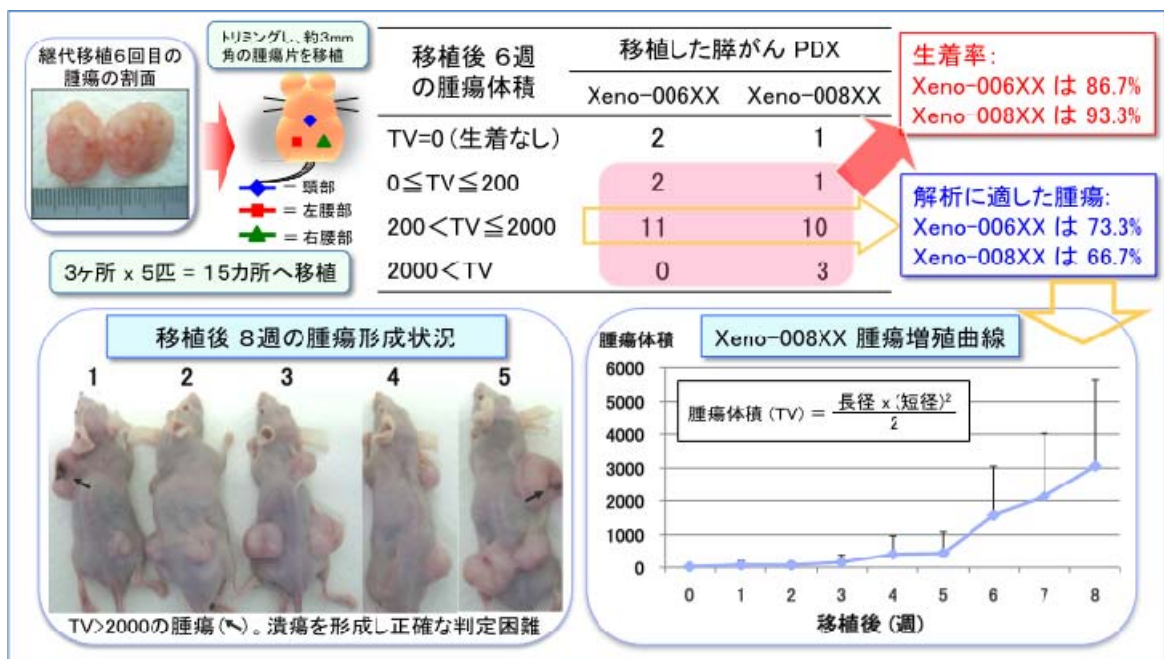
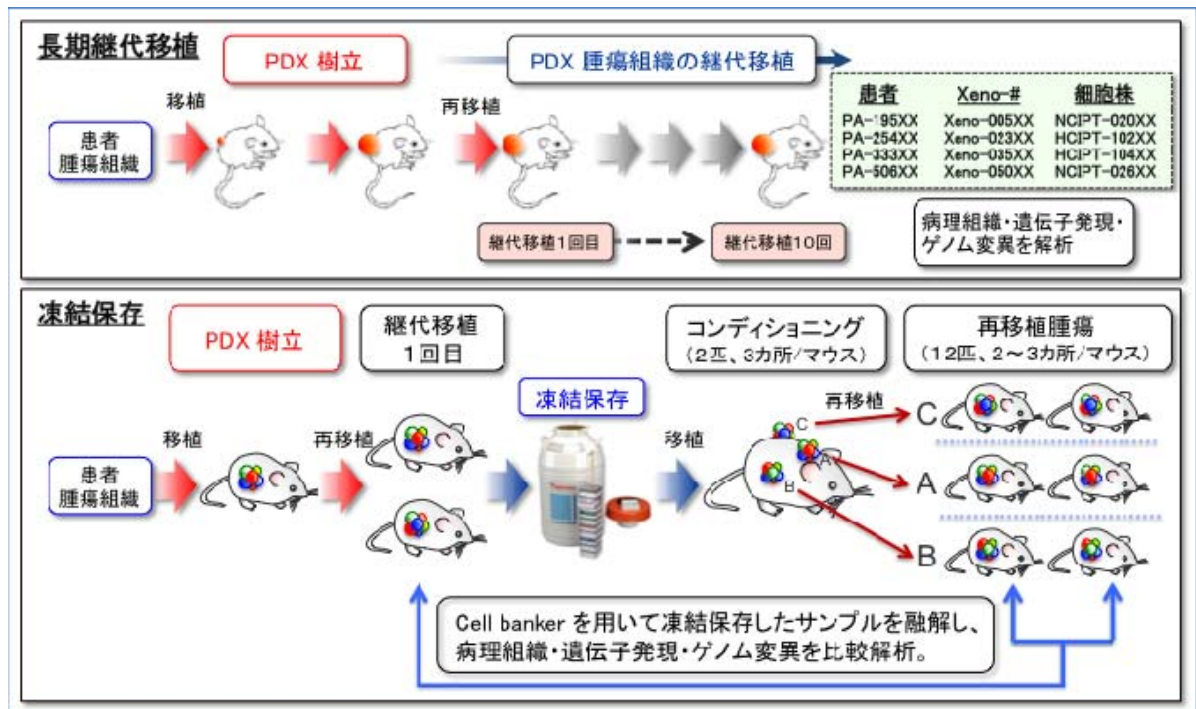


図 4 の中の表は、Xeno-006XX 及び -008XX の 2 種類の PDX ラインについてまとめた結果で、生着率は、どちらもおよそ 90% で、解析に適した腫瘍サイズのマウスは約 70% であった。しかも右下のグラフに示すように再移植後の腫瘍の増殖速度は解析に適したスピードであったことから、「PDX は腫瘍の生着率が良く、腫瘍増殖も安定していることから、薬効や治療効果の判定に 応用可能なモデルマウスである」、といえる。

加えて樹立に成功した PDX ラインを整備し、腫瘍組織を保存しておくことは、「がん研究のリソースを確保する」といった観点からも非常に重要である。特に PDX 腫瘍組織の「凍結保存」と「必要に応じた再移植法」は必須の技術であり、がん研究会では「継代移植法」に加えて、次に「凍結保存法」について検討をおこなった（図5）。

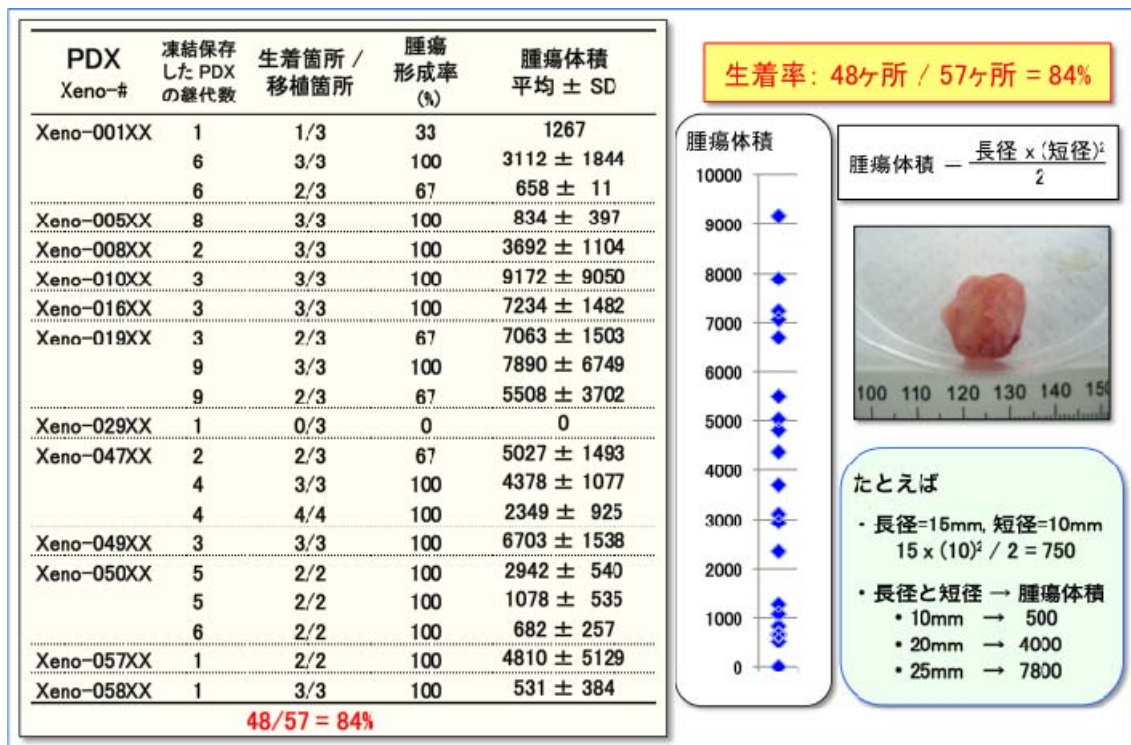
図5 長期継代移植及び凍結融解後の PDX 腫瘍組織の検証



「継代移植法」及び「凍結保存法」による PDX ラインの維持には、それぞれ、一長一短がある。「継代移植法」では、いつでも PDX ラインが使用可能といったメリットはあるものの、各 PDX ラインの維持には、莫大な飼育スペースを必要とし、手間ひまと経費がかかる、といった難点がある（稀に、ラインによっては、無理をさせると継代の途中で途絶えてしまう場合がある）。一方、「凍結保存法」による PDX ラインの維持では、前記の負担は少ないものの、実験に使用可能な PDX ラインの質と必要数を確保するまでに少し時間がかかる、といったデメリットがある。

セルバンカーを用いて凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織を、融解後、移植した PDX の腫瘍組織の品質について、「継代移植法」と同様の解析をおこない検証した。具体的には、まず始めに組織凍結保存液、セルバンカーを用いて凍結保存しておいた 12 ラインの膵がん PDX 腫瘍組織を、融解後に移植した際の生着率、移植率、及び腫瘍サイズについて検証した（図6）。「移植率は 95%（19/20 匹）」で、「生着率は 84%（48/57 箇所）」と、継代移植法とほぼ同等で、非常に効率良く生着し、腫瘍形成が認められた。しかしながら、腫瘍体積は図6中に示すように、たとえ Xeno-001XX や Xeno-050XX のように同じ PDX ラインであっても、大きなバラツキが認められた。

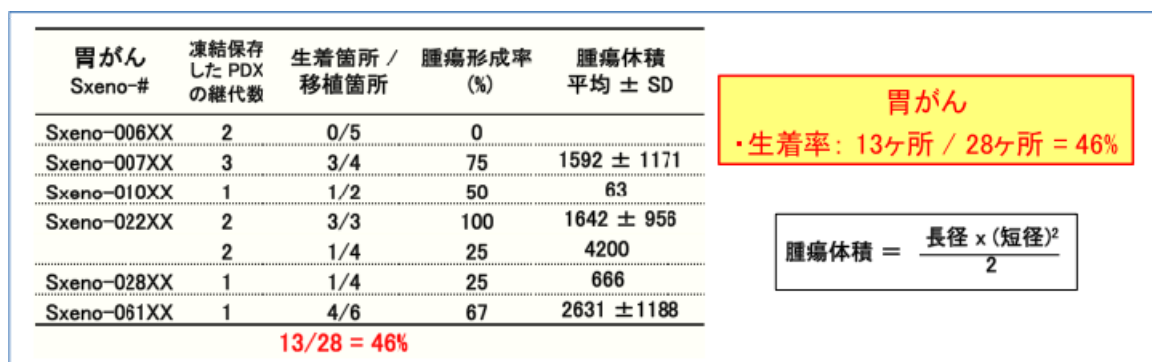
図6 膵がん PDX 腫瘍組織の凍結融解・移植後の腫瘍形成能



このように、凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織のなかには、融解・移植後、直ちに実験に使用するには好ましくない場合がある。したがって、凍結保存サンプルを用いて薬効評価等の治療実験を開始する前には、いったんコンディショニングを行った後、再移植し安定した PDX 腫瘍組織を用いる必要がある、といった時間的な制約がある。

図7は、膵がんの場合と同様に、セルバンカーを用いて凍結保存しておいた6ラインの PDX 胃がん腫瘍組織を、融解後に移植した際の、生着率、移植率、及び腫瘍サイズについてまとめた結果である。

図7 胃がん PDX 腫瘍組織の凍結融解・移植後の腫瘍形成能

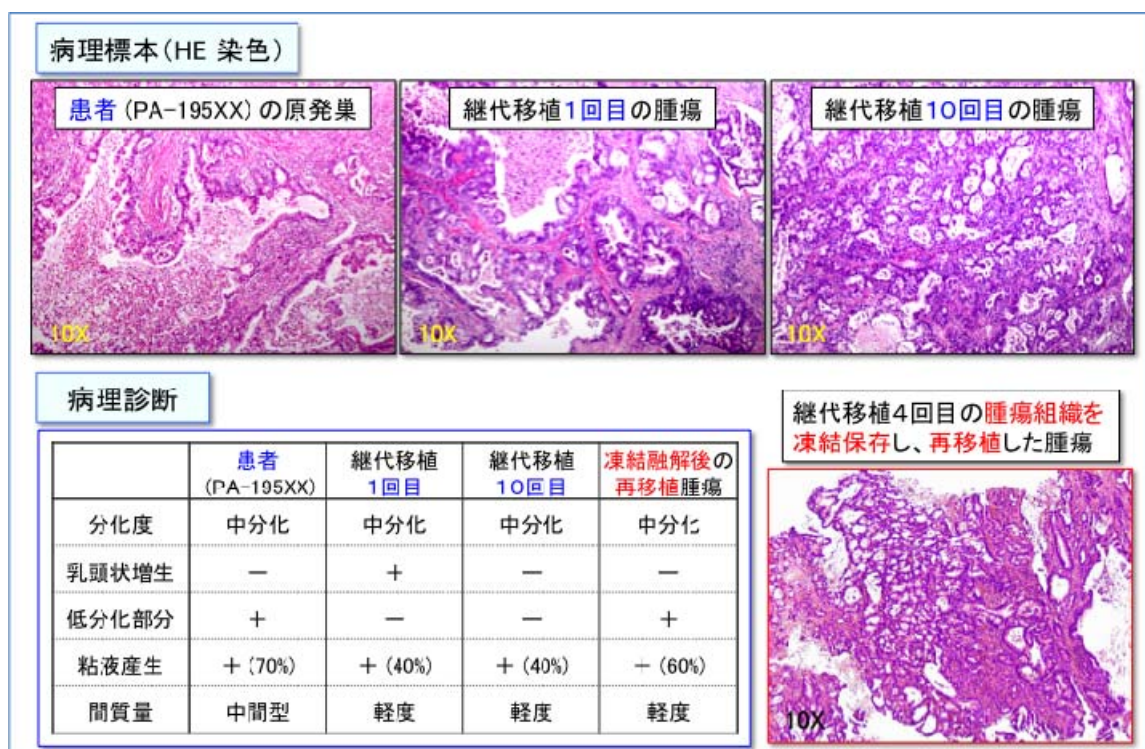


「移植率は83% (10/12匹)」で、「生着率は46% (13/28箇所)」と、継代移植法とほぼ同等であったが、膵がんの場合と同様に、生着し形成された腫瘍体積には大きなバラツキが認められた。したがって胃がんの場合でも、凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織を用いた本実験には、

いったんコンディショニングし、再移植する必要がある。

次に、凍結保存しておいた膵がん PDX サンプルの「組織型（構築）維持の確認」について検証をおこなった（図 8）。凍結保存しておいた「継代移植 4 回目」の PDX 腫瘍組織を、融解後、移植・再移植して生着した PDX 腫瘍組織の「HE 染色標本の病理医の診断結果」から、再移植して生着した腫瘍組織型（構築）は、患者原発巣の分化度や組織型（構築）を保持していること、また、短期・長期継代していた PDX 腫瘍組織とも極めて良く類似している、ことが確認された。言い換えれば、これまで手探りでやってきた組織凍結保存液、セルバンカーを用いた PDX 腫瘍組織の「凍結保存の手法」や「融解後の再移植の手技」は、十分に実用的であることを確認することができた。

図 8 凍結融解・再移植後の膵がん PDX 腫瘍組織の組織型（構築）の検証



3) PDX 腫瘍組織の遺伝子発現、多様性維持の検証

前述のように、PDX 腫瘍組織は、病理組織学的診断の結果から患者原発巣の組織型（構築）を維持していることを確認することができ、次に、PDX 腫瘍組織の遺伝子発現について検証した。

分子遺伝学的解析をする上で、「腫瘍組織における正常組織の混入」や「PDX のヒト腫瘍組織へのマウス間質細胞の混入」は、遺伝子発現解析する際に致命傷になるので、がん研究会では、まず始めに、腫瘍組織の凍結切片を作製し、次に、レーザーマイクロダイセクション (Laser Microdissection: LMD) により、ほぼ 90% 以上の純度で腫瘍部位のみを回収後、RNA あるいは DNA を抽出し、精製したサンプルを用いて分子遺伝学的解析を行った（図 9）。

図9 Laser Microdissection (LMD) による腫瘍組織の回収・精製

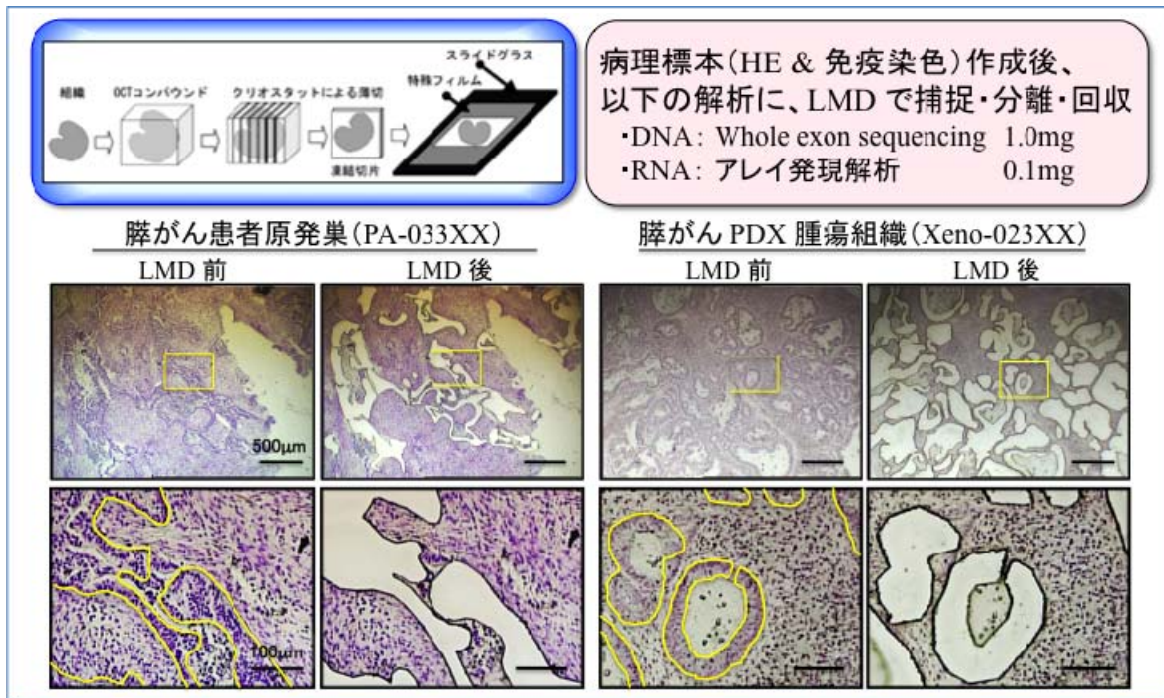
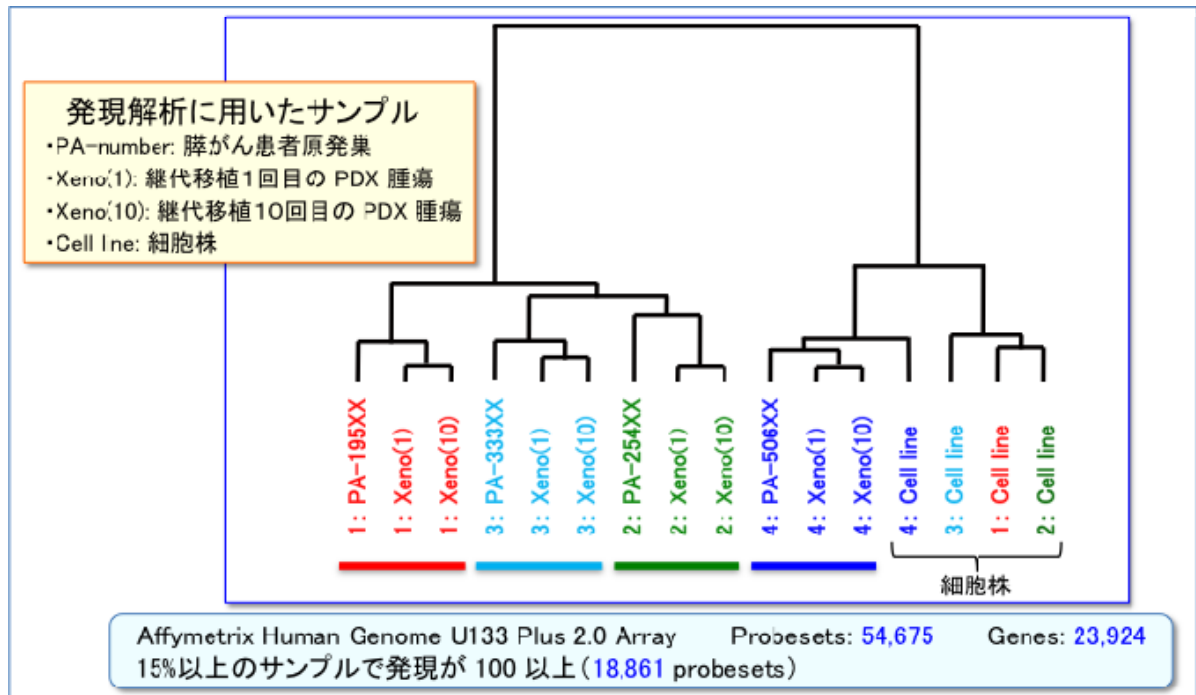


図10は、膵がん4症例の原発巣、長期継代移植した PDX 腫瘍組織 及び 患者原発巣から樹立した細胞株の遺伝子発現をアフィメトリックスの U133 アレイを用いて、unsupervised クラスタリング解析した結果を示す。

図10 膵がん4症例のPDX腫瘍組織のトランスクリプトーム解析

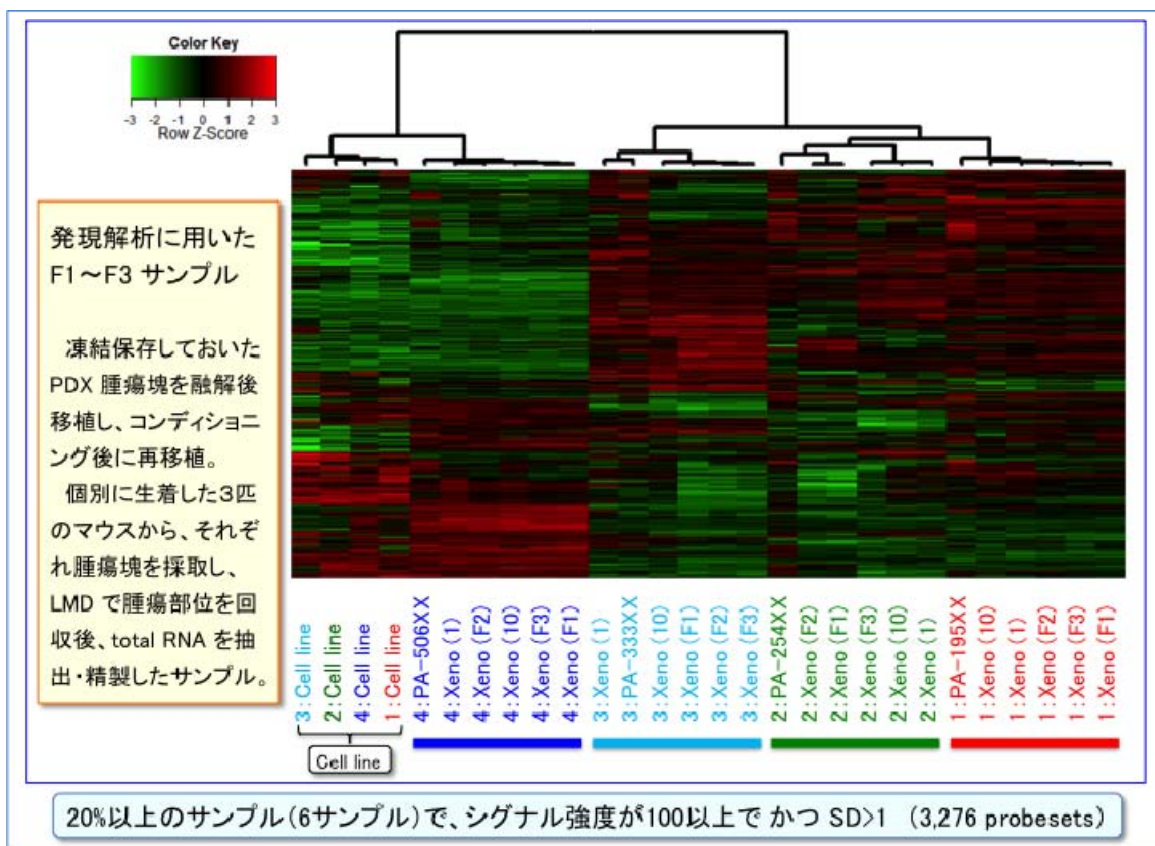


「患者原発巣」と「継代移植した PDX 腫瘍組織」や「患者から樹立した細胞株」を比較した結果、「継代移植1回目 及び 10回目の PDX 腫瘍組織」は、「患者原発巣」と4症例 全てにおいてクラスターを形成したことから、「PDX 腫瘍組織」と「患者原発巣」の遺伝子発現プロファイルは極めて良く似ている、ことが明らかとなった。一方、「細胞株」は 細胞株同士でクラスターを形成し、患者原発巣や PDX 腫瘍組織とはクラスターを形成しなかった。したがって、「細胞株は樹立時において、in vitro の環境に適応した ある特定の集団やクローンが選択され、in vitro の環境に適合し、有利になった集団が選択されてきた」、といったバイアスがかかった可能性が示唆される。

以上のように、今回の「マイクロアレイを用いた遺伝子発現」の解析結果は、病理医の (HE 染色標本の) 病理組織診断結果である、「PDX 腫瘍組織は長期にわたり継代移植を繰り返しても患者原発巣の腫瘍組織型 (構築) を極めて良く保持している」、といった結果を支持する結果であった。

次に 凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織を融解し、再移植した腫瘍組織の (マイクロアレイを用いた) 遺伝子発現を検証した (図11)。「それぞれ F1~F3 で示している凍結・融解後再移植した3サンプル」は、凍結サンプルを いったんコンディショニングをした後 (図5の下段)、再移植し (12匹のマウスへ) 生着した24ヶ所以上の腫瘍組織から、無作為に選択した3サンプルで、これらをマイクロアレイ発現解析で検証した。ただし、コンディショニング前の凍結融解後に移植し生着した腫瘍は、腫瘍の増殖速度やサイズのバラツキが大きいため、解析対照にしていない。

図 11 凍結融解後・再移植した膵がん PDX 腫瘍組織のトランスクリプトーム解析-1

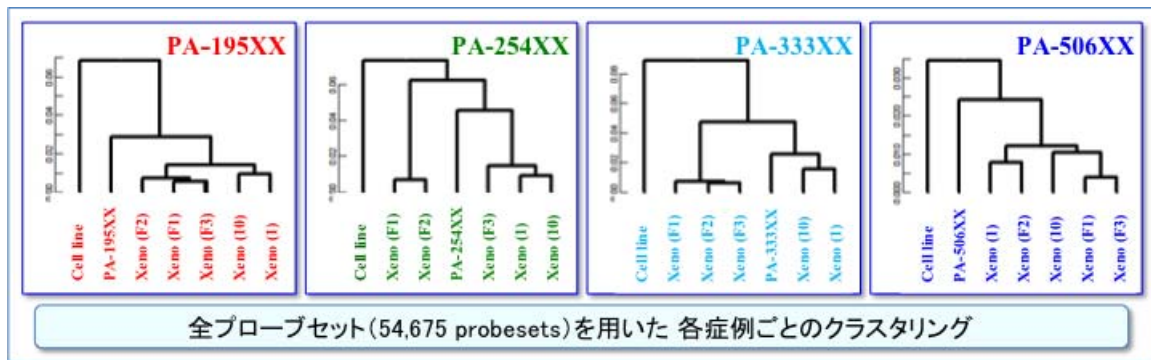


先ず始めに、凍結融解後に再移植し生着した PDX 腫瘍組織を、患者原発巣、Xeno(1), Xeno(10)、細胞株と比較した。「20%以上のサンプル(6サンプル)で、シグナル強度が100以上でかつ SD>1」といった「全28サンプルで、明確に発現し、サンプル間で大きく発現変動している遺伝子」で比較した結果、明らかに「凍結融解後・再移植して生着した PDX の3サンプル」は、4症例のいずれにおいても、全て、「患者原発巣」や「継代移植の PDX 腫瘍組織」とクラスターを形成し、「細胞株」とは明確にクラスターが分かれた。したがって、これらの結果から、凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織は、細胞株と比較し、凍結保存・融解後の再移植によっても患者原発巣の遺伝子発現を極めて良く維持している、ことを確認することができた。

次に、マイクロアレイの「全 54,675 プローブセット、23,924 遺伝子」で比較した結果においても前述と同様で、細胞株とは明確にクラスターが分かれた。4症例全てにおいて、凍結融解後・再移植した PDX 腫瘍組織は、患者原発巣 及び 継代移植の PDX 腫瘍組織とクラスターを形成したことから、「凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織」は、長期移植継代と同様に、病理組織学的な組織型(構築)の保持ばかりでなく、遺伝子発現プロファイルにおいても患者原発巣を良く反映し、細胞株よりも類似していることを今回、初めて確認し明らかにすることができた。

更に 全 54,675 プローブセットを用いて、それぞれ4症例を個別にクラスタリング解析をおこなった結果(図12)、以下のような興味深い知見が得られた。

図 12 凍結融解後・再移植した膵がん PDX 腫瘍組織のトランスクリプトーム解析-2



一つは、凍結融解後・再移植した各 3 サンプルの「クラスタリングのパターンは、4 症例において、それぞれ異なる」点である。たとえば、PA-195XX、PA-254XX、PA-506XX の F1～F3 は、

- ・クラスタリングに 一定の傾向は無く（分布も一様ではなく）、
- ・一つの偏りのあるクラスター（集団）になっておらず、 更に
- ・類似性の程度も異なる（Y 軸の山の高さ）

ことから、凍結保存しておいた PDX 腫瘍組織の「融解・再移植後にマウスへ生着した腫瘍組織」は、凍結融解・再移植といった一連のストレスから、「偏った腫瘍組織のみが選択されて、同様なポピュレーションの腫瘍組織が免疫不全マウスへ生着した可能性は低い」、言い換えれば、「凍結以前のある程度の多様性が保持された腫瘍組織が免疫不全マウスへ生着した」ことが強く示唆される。

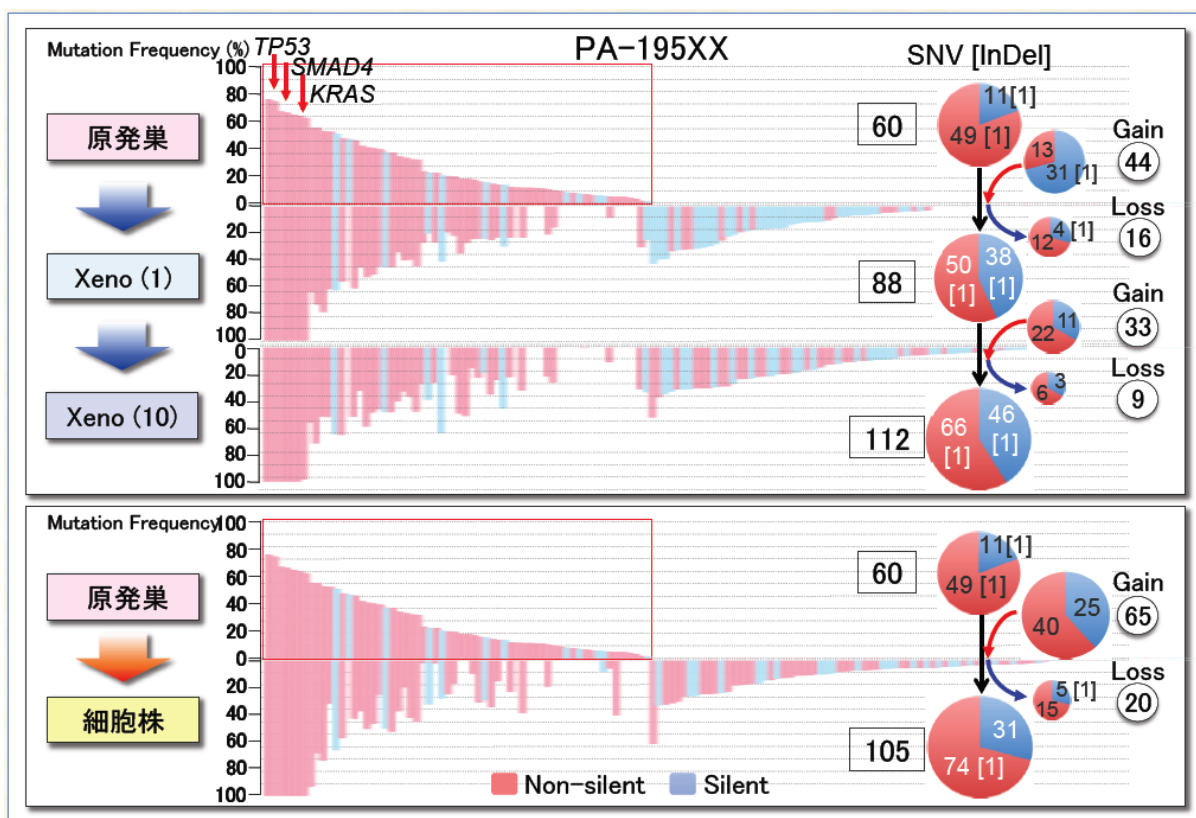
もうひとつは、4 症例いずれの場合でも、「凍結融解後・再移植した PDX 腫瘍組織」は、細胞株と比較し、「継代移植の PDX 腫瘍組織」や「患者原発巣」の遺伝子発現と類似していることを確認することができた、点である。

4) 膵がん PDX 腫瘍組織の遺伝子変異、多様性維持の検証

次に、病理組織診断や遺伝子発現解析に加えて、多様性の維持を検証するため、「体細胞変異の推移」について、6 症例の膵がんサンプルで検証した。遺伝子変異解析は、次世代シーケンサーを用いて、ホール エクソン シーケンスを行い、「ゲノム変異」はそれぞれペアの正常組織を対照として比較解析した。図 1 3 は「膵がん患者 PA-195XX の原発巣」から「PDX 腫瘍組織」及び「細胞株」樹立時における「1 塩基違いの SNV (single nucleotide variant)」と「2 塩基違いの、deletion と insertion である small InDel」の推移に関して検証した結果を示す。

図 1 3 の上段は「患者原発巣」と「Xeno (1)、Xeno (10) 腫瘍組織」の比較、下段は「患者原発巣」と「細胞株」の比較した結果で、縦軸は変異頻度、横軸は患者原発巣で検出された「SNV と small InDel」の変異頻度の高い遺伝子から表記している。また、図 1 3 右の円グラフには、「患者原発巣」から「PDX 継代移植 1 回目から 10 回目の腫瘍組織」あるいは「細胞株」の樹立の過程において、「SNV と small InDel」の推移数を数字で、変異の質的な違いとして、「赤は、アミノ酸置換を伴う non-silent タイプ」、「青は、アミノ酸の置換を伴わない silent タイプ」をそれぞれ示している。加えて 患者原発巣から PDX 腫瘍組織や細胞株樹立の過程で、「新たに獲得した変異数」と「消失した変異数」についても示している。

図 13 膵がん患者原発巣の体細胞変異 (SNV と small InDel) の推移



その結果、「PDX 樹立時」に獲得した変異数とアミノ酸置換の割合は、「細胞株樹立時」と比較して少ないことが解る。具体的には、「Xeno (1)」では 88 個の遺伝子変異のうち、60%がアミノ酸置換を伴う non-silent タイプであるのに対し、細胞株では 105 個の変異のうち、70%が non-silent タイプであった。また「Xeno (10)」においては、変異数は細胞株樹立時よりも増えているものの、アミノ酸置換を伴う non-silent タイプの割合は 60%と、細胞株の 70%ほど増加していなかった (実質、Xeno (10) は 74 個に対し、細胞株は 78 個)。更に、これまでにヒト膵がん症例で報告の多い TP53, KRAS, Smad4 といった遺伝子への変異は、6 症例全てにおいて、患者原発巣から PDX 腫瘍組織 及び 細胞株樹立時に、安定に保持されていることが明らかとなった。

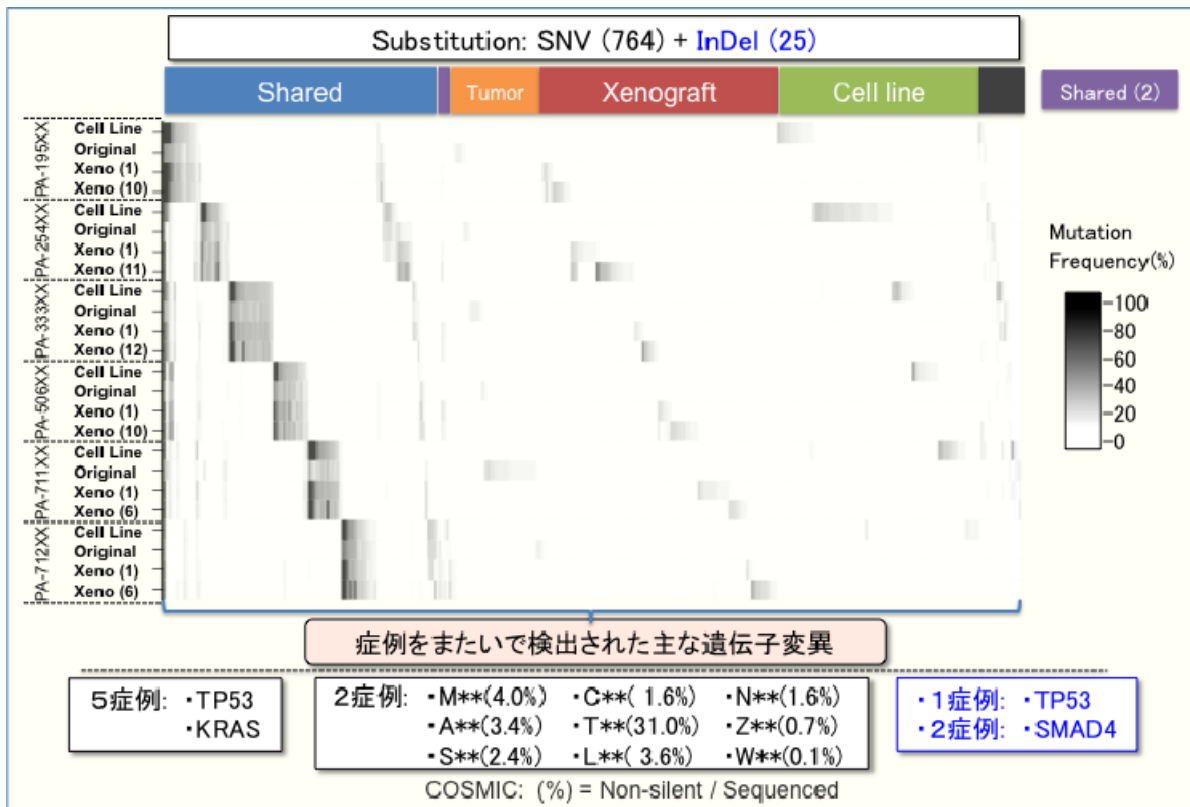
また 患者原発巣の遺伝子変異に関して、PDX 腫瘍組織 及び 細胞株を比較解析した結果から、

1. 変異頻度の低い遺伝子は、細胞株でも PDX でも失われ、
2. 中程度の変異頻度のものは、圧倒的に PDX の方が維持されており、
3. PDX の新たな獲得変異は、細胞株と比較し、「アミノ酸置換の伴わない silent タイプが多い傾向にある」といえる。これらの解析結果は、長期継代移植した Xeno (10) においても同様であった。

このように、「PDX 腫瘍組織」は「細胞株」と比較し、膵がん患者の原発巣の「SNV と small InDel」といった遺伝子変異を長期間維持していることを 今回初めて確認にすることができた。今後の課題として、Large InDel、Copy NV や LOH、エピゲノム修飾の解析結果を考慮し、PDX の腫瘍組織が患者の原発巣の多様性を保持していることを総合的に判定する必要がある。

図 14 は、「ゲノム変異率」と「検出された主な遺伝子変異」について、6 症例の膵がん、各 4 サンプル (原発巣、Xeno (1) と Xeno (6)~(10) 腫瘍組織、細胞株)、合計 24 サンプルで検出された「764 個の SNV」と「25 個の small InDel」について まとめた結果を示す。

図 14 膵がん 6 症例のゲノム変異率と検出された主な遺伝子変異



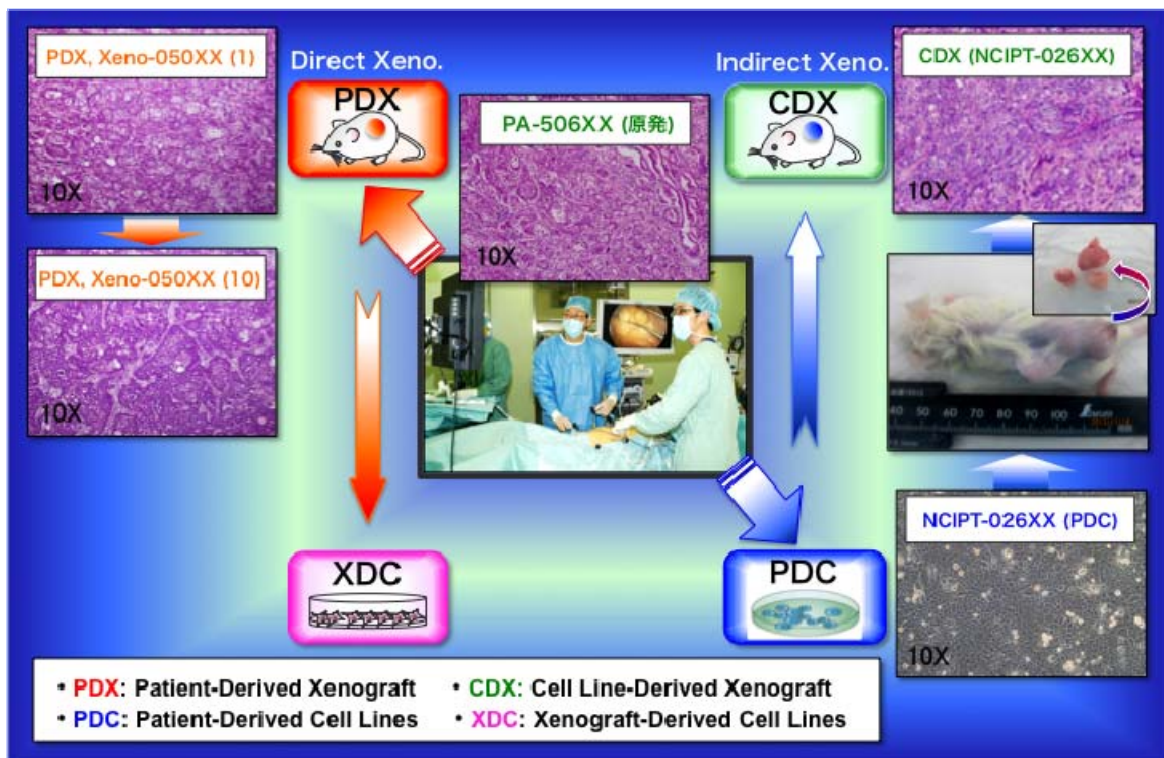
上段は、6 症例の「患者原発巣、PDX 継代移植 1 回目と 10 回目の腫瘍組織 及び 患者から樹立した細胞株」のゲノム変異率について、「縦軸は各症例のサンプル」を、「横軸は、SNV と small InDel の検出」を、「全ての症例で共通」、「PDX 腫瘍組織のみ」に、あるいは「細胞株のみ」に分類し、ヒートマップで表示している。また、下段には、「症例をまたいで検出された主な遺伝子変異」を示している。

ゲノム変異率は、6 症例とも 各症例のサンプル間（患者原発巣、PDX 腫瘍組織、細胞株）で良く保持されており、「P53」や「KRAS」は、6 症例 24 サンプル全ての症例で検出され、PDX 腫瘍組織や細胞株で、これらの遺伝子変異は安定に維持されていることが解った。また、small InDel タイプとして、今回のサンプルに、「TP53」は 6 症例中 1 症例で、「SMAD4」は 6 症例中 2 症例で、検出された。他に、2 症例で、細胞増殖、細胞周期や細胞分裂に関与する「9 遺伝子」に変異が検出され、これらの 9 遺伝子は、「がんゲノムデータベースの COSMIC」で既に報告されており、こういった遺伝子への変異が、今回解析した膵がんの症例に検出されたことは興味深く、これらの遺伝子変異の意義や機能的解析は、今後の課題である。

5) CDX 腫瘍組織の組織構築、遺伝子発現、多様性維持の検証

更に興味深いことに、Nude マウスや NOD/SCID マウスに生着しなかった 6 症例の膵がん患者由来の樹立後早期の細胞株を NSG マウスへ移植した結果、5 種類の細胞株が生着し造腫瘍性が認められた。これらの CDX (cell-derived xenograft) の腫瘍組織は、病理医による病理組織診断の結果、2 例で患者原発巣の組織型（構築）の維持が確認された（図 15）。

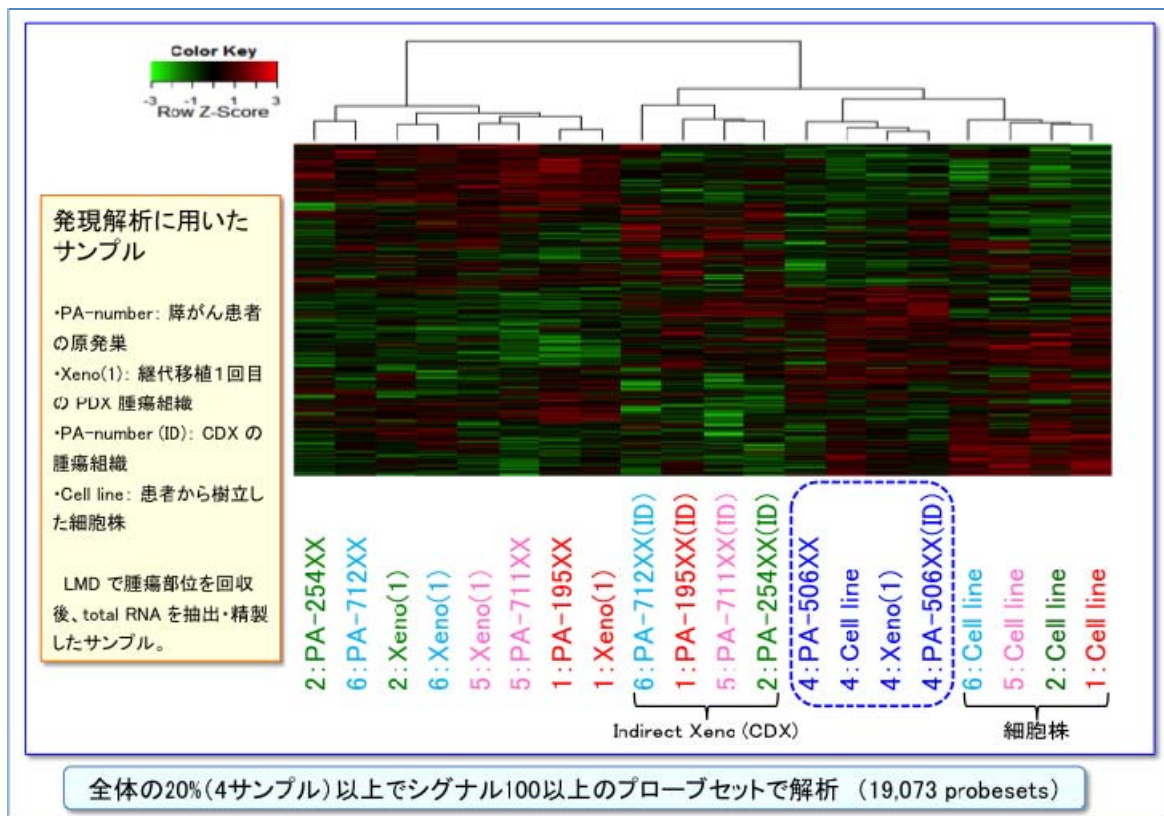
図 15 膵がん細胞株を NSG マウスへ移植し生着した腫瘍組織の組織型（構築）の検証



- ・ PA-506XX : 膵がん患者 (PA-506XX) 原発巣の腫瘍組織
- ・ PDX, Xeno-050XX (1) : 継代移植 1 回目の PDX ライン、Xeno-050XX の腫瘍組織
- ・ PDX, Xeno-050XX (10) : 継代移植 10 回目の PDX ライン、Xeno-050XX の腫瘍組織
- ・ CDX (NCIPT-026XX) : 膵がん細胞株 NCIPT-026XX 由来の CDX 腫瘍組織
- ・ NCIPT-026XX (PDC) : 膵がん患者から樹立した細胞株

また これら NSG マウスに生着した 5 株由来の CDX 腫瘍組織の遺伝子発現を、Affymetrix U133 Plus 2.0 Array を用い、全体の 20% (4 サンプル) 以上でシグナル 100 以上のプローブセットで解析 (19,073 probesets) した結果、PA-506XX の CDX 腫瘍組織は、細胞株よりも Xeno(1) の腫瘍組織の遺伝子発現に類似し、クラスターを形成することを確認することができた (図 16)。

図 16 膵がん細胞株を NSG マウスへ移植し生着した腫瘍組織のトランスクリプトーム解析



- ・ PA number : 膵がん患者の原発巣の腫瘍組織
- ・ Xeno (1) : 継代移植 1 回目の PDX ラインの腫瘍組織
- ・ PA number (ID) : 膵がん細胞株由来の CDX 腫瘍組織
- ・ Cell line : 膵がん患者から樹立した細胞株

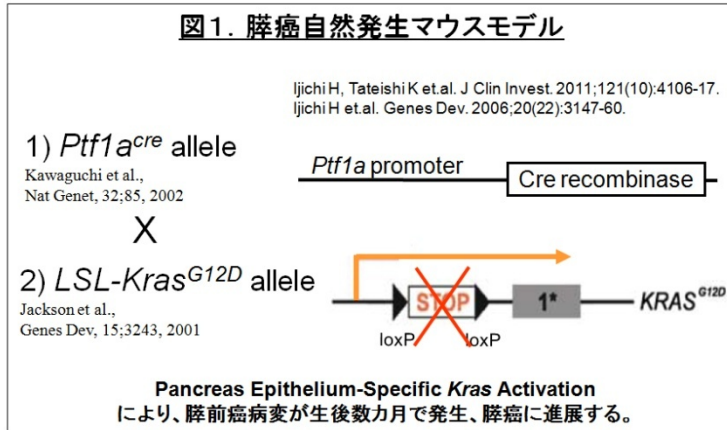
これらの解析結果から、細胞株の移植による CDX が、組織型（構築）や遺伝子発現において、原発巣との類似性を獲得できたことは、患者原発巣から細胞株樹立時に固定された獲得遺伝子変異あるいは消失した遺伝子変異によるというよりも、「細胞株のなかには生体へ生着する際、ホストとの微小環境に適合したエピゲノム修飾を含む遺伝子の高次構造の可逆性が可能な状態にある」ことを強く示唆している。なおこれらのサンプルのエピゲノム修飾の解析は今後の課題である。

患者原発巣、PDX 腫瘍組織、及び細胞株のエピゲノム解析については着手し始めているところで、今後の課題である。プロファイリングとデータベースの構築及びこれら一連の解析結果から得られる情報は、詳細な臨床情報が付随する同一がん組織の手術材料を起点としているため、極めて独自性が高く、また PDX 腫瘍組織がヒトがん組織のモデルとしての妥当性が確認されれば、臨床応用へとより一層の付加価値が高まる。ヒトがん組織の直接移植による PDX とそこから得られる培養細胞株、さらにそれぞれの病理組織診断、トランスクリプトーム情報及びゲノム・エピゲノム情報を有する研究リソースは、由来を同一にする研究リソースとして他に類を見ない独自性があり、今後薬物治療法の治療効果のバリデーションをはじめ、新たな分子機能の解明、あるいはバイオマーカーやがん治療分子標的の同定等に結びつくことが十分に期待される。

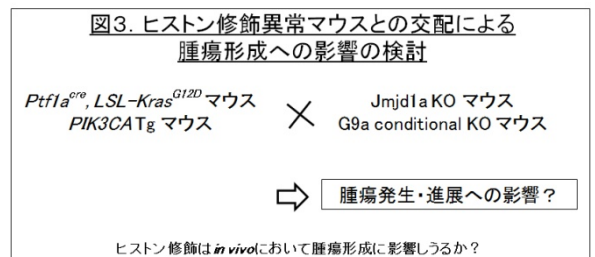
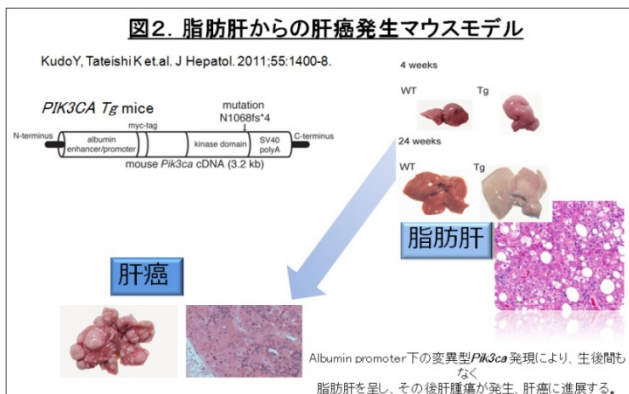
③ エピゲノム変異発がんモデルの研究開発

A) 既存がんモデルの解析

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



1. 発がんモデル実験に用いるマウスを得るため、膵がん(*Ptf1a^{cre}, LSL-Kras^{G12D/+}*)発症モデル (図1) あるいは肝がん(*PIK3CA-tg*)発症モデル (図2) マウスと *Jmjd1a* 欠損マウスおよび条件的 *G9a* 欠損マウスの交配を行った (図3)。ひとつの研究成果として、今回用いた脂肪肝からの肝発がんモデルと *Jmjd1a* 欠損マウスとの交配実験の結果、*Jmjd1a* がこの腫瘍形成機序に重要であることが明らかとなってきた。*Jmjd1a* が欠損した状態では過剰発現した *PIK3CA* 遺伝子の間の発現量に影響はなく、それに伴う脂肪蓄積にも変化を呈さなかった。しかしながらその後の肝腫瘍形成はほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。興味深いことに *In vitro* において肝がん細胞で *JMJD1A* をノックダウンすると、その腫瘍形成能が消失する知見も見出しており、このことは *JMJD1A* が *in vivo* での腫瘍形成能を促進する役割を担うことを裏付けるものであった。そこで *Jmjd1a* の有無による肝腫瘍形成の違いに関わる遺伝子群を明らかにするために、両群の背景肝における網羅的な遺伝子発現解析を行った。その *Ontology* 解析では肝腫瘍形成に細胞—細胞間のクロストークが影響を与えている可能性を示唆するものであり、解析を進めている。



B) 新たながんモデルの開発とその表現型のエピゲノム解析

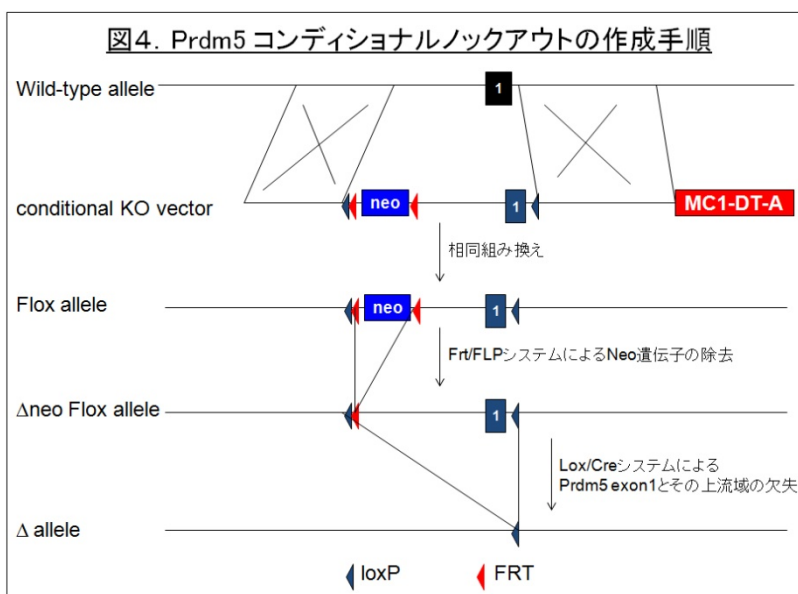
PR (PRDI-BF1 and RIZ) ドメインタンパク質 (PRDM) は、PR ドメインと zinc-finger ドメインを持つ分子ファミリーで、PR ドメインはヒストンリジンメチル化活性を持つ SET ドメインとも相

同性を有することから、SET ドメインサブファミリーと分類されることもある。実際、PRDM のいくつかはヒストンリジンメチル化活性を示す。

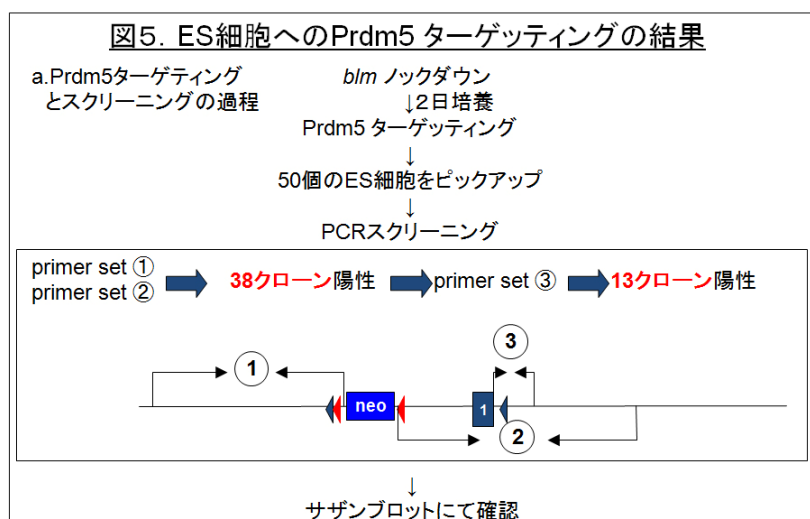
近年の解析から、PRDMはさまざまな細胞の運命の決定に重要な役割を果たすこと、さらにがん細胞において、その発現が消失することが報告されている。PRDM5は、さまざまな種類のヒトがん細胞において、その発現が抑制されていることが知られている分子で、PRDM5をPRDM5陰性のがん細胞に強制発現させると、細胞増殖を阻害することも報告されている。

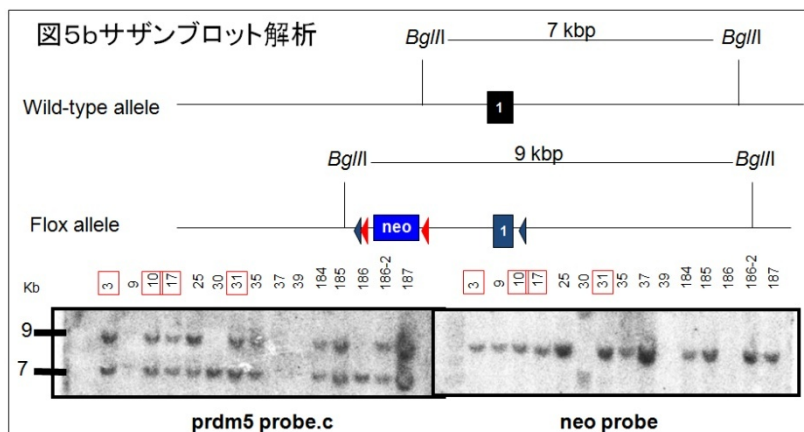
新たな発がんモデルの開発とその表現型のエピゲノム解析のため、PRDM5コンディショナルKOマウス作成を開始し、目的とする変異を持つマウスラインを得た。さらに、外来性のFlag-Prdm5をマウスのNIH3T3細胞に恒常的に発現させた細胞株を樹立し、抗Flag抗体を用いたFlag-Prdm5のChIP-seq解析を行った。

Prdm5 ノックアウト ES 細胞の樹立と KO マウスラインの作成：



マウス ES 細胞 KY1.1 に *Bloom* ノックダウン用ステルス RNA をトランスフェクションし、培養 48 時間後、*Prdm5* KO ベクターをトランスフェクションした。G418 耐性のコロニーをピックアップし、図 5 で示されているプライマーセット①、②でスクリーニングの結果、50 個解析したうち 38 個が目的の細胞であることが判明した。さらに、Exon1 の下流に *loxP* 配列も存在しているか、プライマーセット③でスクリーニングした結果、38 クローン中 13 クローンでその存在を確認できた。





最後にサザンブロット解析を行い、*Neo*プローブで予想されるサイズにバンドが1つだけ出るクローンの中から4つを選んで(図5bの赤で囲んだ番号のクローン)、キメラマウスを作製した。その後の交配の結果、うち3ラインでgermline transmissionを確認した。

Prdm5 の ChIP-seq 解析による標的遺伝子の同定：

外来性の Flag-Prdm5 をマウスの NIH3T3 細胞に恒常的に発現させた細胞株を用いた Flag-Prdm5 の ChIP-seq 解析を行ったところ、Prdm5 は遺伝子の転写開始点に強い局在特異性を有することが明らかとなった(図6)。例えば Prdm5 の標的遺伝子その1(図7)。さらにモチーフ解析の結果(図8)、GAGA-binding factor の結合モチーフと類似した配列が濃縮されてくることが分かってきた。今後は、ノックアウトマウス由来の細胞を用いながら Prdm5 の ChIP-seq データの評価を行い、本当にこれらの標的遺伝子の転写制御に寄与しているのかを調べて行く予定である。

図6. Flag-Prdm5のChIP-seq解析の結果

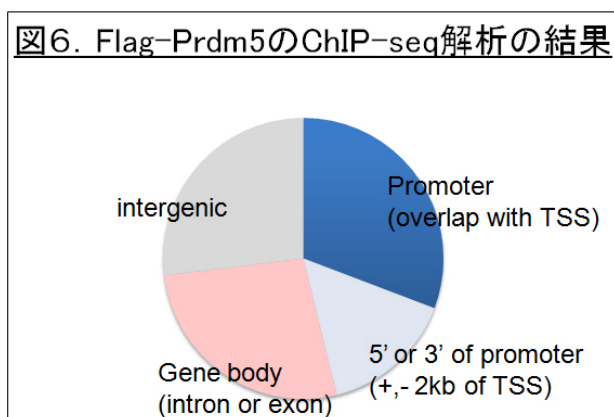


図7. Prdm5の標的遺伝子 その1

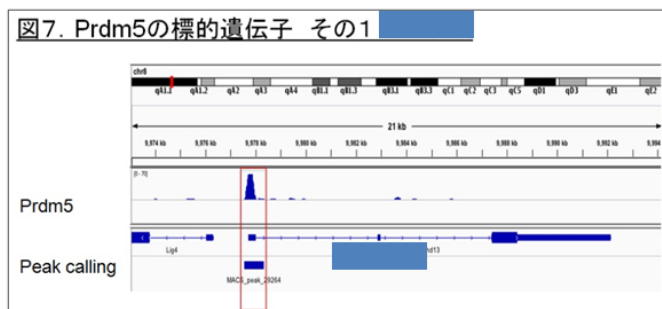


図8. Prdm5の結合モチーフ



④ エピゲノム修飾の特異性を規定する非コード RNA 機能の研究開発

近年、ポストゲノム解析によって発見された長鎖非コード RNA が、クロマチンのヒストン修飾の特異性を規定する可能性が浮上し注目を集めている。これまでに特定の非コード RNA が、遺伝子のサイレンシングを引き起こすヒストンメチル化転移酵素複合体 PRC2 と RNA-タンパク質複合体を形成すること、また非コード RNA の働きによって PRC2 が特定の標的遺伝子クロマチン領域に作用できることなどが明らかにされ、非コード RNA はエピゲノム制御の特異性を規定する重要な役割を果たしていることが明らかになってきた (図 1)。さらに、特定の非コード RNA の異常発現によって、数百のタンパク質遺伝子領域のヒストン修飾パターンがリプログラミングされ、

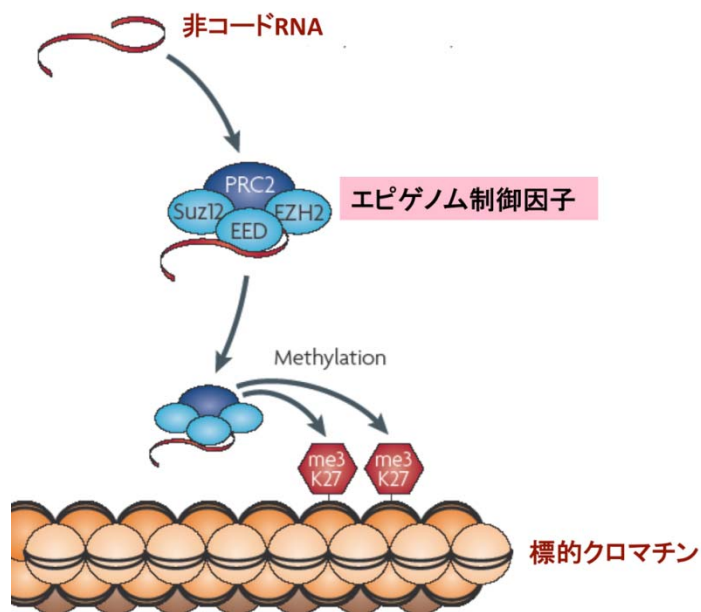


図 1 非コード RNA によるエピゲノム制御の特異性規定モデル

その結果として乳がん細胞の高い転移能が獲得されることも明らかになった。こうしたことから、非コード RNA を介したエピゲノム修飾機構の破綻が、がん化、がんの病態変化に極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆される。さらに、エピゲノム制御を標的とした医薬品開発を目指す上で、エピゲノム制御の特異性を規定する非コード RNA の作用機構の解明は重要である。こうした背景において、これらの長鎖非コード RNA の中から重要なエピゲノム制御を司る非コード RNA を同定し、その作用機構を解明することを目標に以下の解析を実施した。

(1) 長鎖非コード RNA 探索システムの構築

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

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

(2) 臨床腫瘍で発現している非コード RNA の探索

(1)で確立した RNA-Seq からの「非コード RNA 領域の特定」「発現変動検出」のシステムを用い、がん培養細胞株に続いて臨床検体を用いた解析を実施した。4名の大腸がん患者臨床検体（同一患者由来の原発巣、肝転移巣、隣接非がん部）、計 12 検体について RNA-Seq を実施し、まず転写領域を同定した。発現量の高くない新規非コード RNA の同定には正確な転写領域の決定が重要であると考え、各腫瘍で 1 億リードペア以上、各 100 塩基長という通常より大きな規模で RNA-Seq を行った。

12 検体の RNA-Seq データを個別にリファレンスゲノムへマッピングし、約 17 万余りの転写産物を推定し、それらを約 7 万の推定転写領域として統合した。各種データベースと照合した結果、既知の蛋白質コード遺伝子が約 1.8 万 (27%)、既報のある非コード RNA が約 2.1 万(29%)であったのに対し、全く新規の推定非コード RNA が約 3.1 万(44%)と非常に多く見出された。

次に、これら推定転写領域から、大腸がんで発現亢進している非コード RNA の選抜を行った。大腸がんで上昇している非コード RNA を、全く報告のない新規なものも含め数百種見出した。

一方、エピゲノムを制御しうる大腸がん発現非コード RNA を網羅的に同定するため、(1)で用いたヒト大腸がん細胞株を用いて PRC2 の構成蛋白質の抗体を用いた核内 RNA の RIP-Seq 解析を実施し、PRC2 と結合し得る大腸がん発現非コード RNA を約 50 種選抜した。

さらに新たな試みとして、腫瘍環境に応じて発現変化する非コード RNA を探索する研究を実施した。がん細胞株をより臨床がんに近い条件で培養し、発現する RNA を RNA-Seq により網羅的に取得した。見出した非コード RNA の一部は現在機能解析中である。

(3) 核酸医薬標的としての非コード RNA の機能評価

本プロジェクトで見出したがんで選択的発現を示す非コード RNA について、創薬標的、特に核酸医薬 (siRNA, Antisense Oligonucleotide(ASO)) としての可能性を見極めるため、機能解析研究を実施した。

まず、大腸がんで高効率で活性化が見られる β -カテニンによって誘導を受ける非コード RNA として 7 種、19 バリエーションを見出した (PCT 特許出願中)。うち、最も興味深い RNA-A は PRC2 に結合し、siRNA によるノックダウンでがん細胞株増殖抑制活性を示した。shRNA によって RNA-A の発現を 60%程度抑制した細胞をマウス Xenograft とすると、腫瘍増殖が顕著に抑制された。

さらに(2)で選抜した非コード RNA のうち数種について、機能解析を進めている。これら表現型の見いだされた非コード RNA については、抗腫瘍核酸医薬の標的候補と考えられるため、個体レベルでの抗腫瘍活性評価を予定している。

(4) 非コード RNA 制御因子機能に注目した RNA-seq 解析

非コード RNA の多くは、mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写されるが、mRNA とは対照的に細胞核内に局在し機能している。そこで核内に存在する非コード RNA 群の発現をグローバルに制御している因子を同定することを試みた。そしてそれらの非コード RNA 制御因子を人為的に機能破壊した際の非コード RNA 群の発現パターン変化及びそれに伴うゲノムワイドのクロマチンヒストン修飾パターン変化を解析することを目指している。非コード RNA 制御因子としては、非コード RNA に相互作用する RNA 結合タンパク質や非コード RNA の分解酵素などが候補として考えられた。まず非コード RNA の安定化制御、特有の生合成機構に関わる因子を同定するために、本チーム所有のヒト核内の RNA 制御因子の RNA 干渉ライブラリーを用いて、乳がん細胞の転移能獲得に関わる非コード RNA をモデル RNA としてスクリーニングを行い、この非コード RNA の安定性制御に関わる RNA 分解酵素、さらにこの非コード RNA の生合成に関わる RNA 結合タンパク質を同定した。RNA 分解酵素を RNA 干渉によって機能阻害すると、多数の非コード RNA

の蓄積量が著しく上昇することが明らかになり、これらの非コード RNA は、通常この RNA 分解酵素による分解を受けて低レベルに保たれていることが明らかになった。一方、非コード RNA の合成に関わる RNA 結合タンパク質を RNA 干渉で機能阻害したところ、非コード RNA の長さの異なるアイソフォームが産生することが明らかになり、非コード RNA の発現には量的な変動だけでなく、質的な変動も頻繁に起こっていることが示された。また、こうした産生アイソフォームの変化によって、この非コード RNA の既知標的 mRNA の発現が変化することも確認された。

(5) 核内構造体における新たな非コード RNA 制御因子の解析

非コード RNA に結合するエピゲノム制御因子としては、ポリコーム複合体が知られていたが、その後ポリコームと同様に遺伝子発現の抑制方向に作用するヒストン脱メチル化酵素複合体、遺伝子発現の活性化を司るトライソラクス複合体、さらにはその他の様々なエピゲノム関連因子の多くが非コード RNA と複合体を形成するという報告もある。こうした背景の中で、我々は細胞核内エピゲノム制御のハブとして機能すると考えられる核内構造体に注目して、こうした構造体の骨格となる非コード RNA の作用機構とそこに相互作用する因子についての研究を実施した。まずパラスペックルと呼ばれる核内構造体について、その構築機構と作用機構についてを詳しく解析し、NEAT1 という非コード RNA の生合成と共役してクロマチン上で会合していく複数のステップを明らかにした (EMBO J 2012)。さらにプロテアソーム阻害剤などの化合物処理した細胞で、NEAT1 の発現誘導を介したパラスペックルの肥大化が起こることを見出だし、これによって核内に存在する様々な制御因子群が NEAT1 との相互作用を介してパラスペックル内に係留され、その下流の遺伝子発現が負に制御されるメカニズムを明らかにした (Mol Biol Cell 2014)。こうして「非コード RNA 駆動性の分子スポンジ」としての核内構造体の役割が明らかになった。

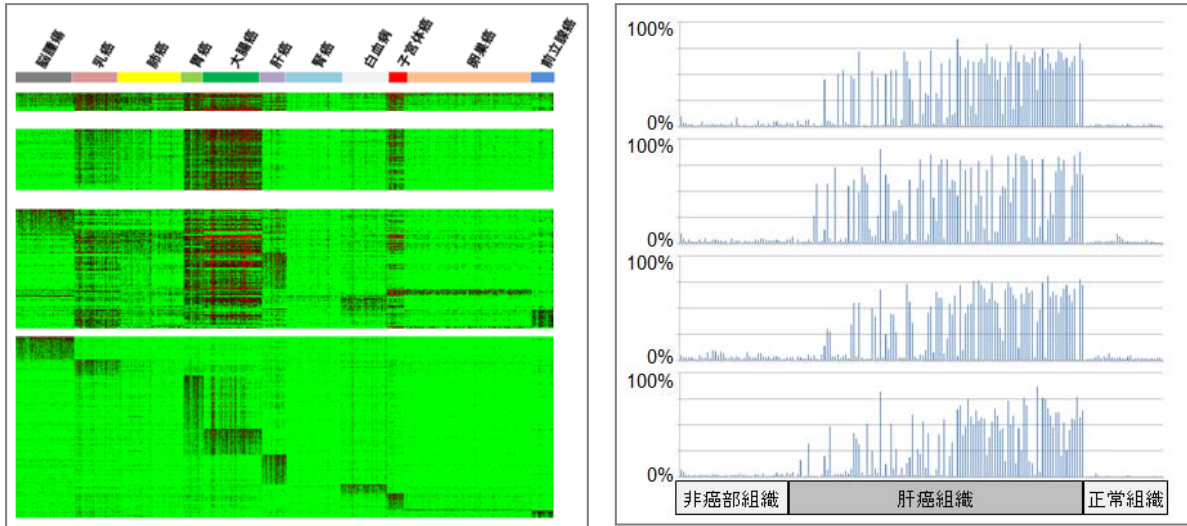
さらに NEAT1 と相互作用するエピゲノム関連因子として、近年がん抑制遺伝子として報告されている A 複合体を新たに同定した。A 複合体は、NEAT1 非コード RNA やその他のタンパク質因子と直接相互作用することによって、この非コード RNA 依存的なパラスペックル構造体の構造構築に必須な役割を果たすことが明らかになった。さらに新たな知見として、これまで知られている A 複合体によるエピゲノム制御活性は、この核内構造体形成には必要ないことが明らかになった。これによって A 複合体には、既知の活性以外に、非コード RNA を介した核内構造構築という新しい機能が備わっていることが示された。またこうした A 複合体の機能は、パラスペックルだけでなく、他の非コード RNA 依存的な核内構造体形成にも同様に必須であることが明らかになった。以上の結果より、A 複合体の新機能は、複数の非コード RNA 依存的な核内構造体形成のために必須なものであることが明らかになった。

(6) がん細胞において選択的に形成される RNA 依存的核内構造体の探索

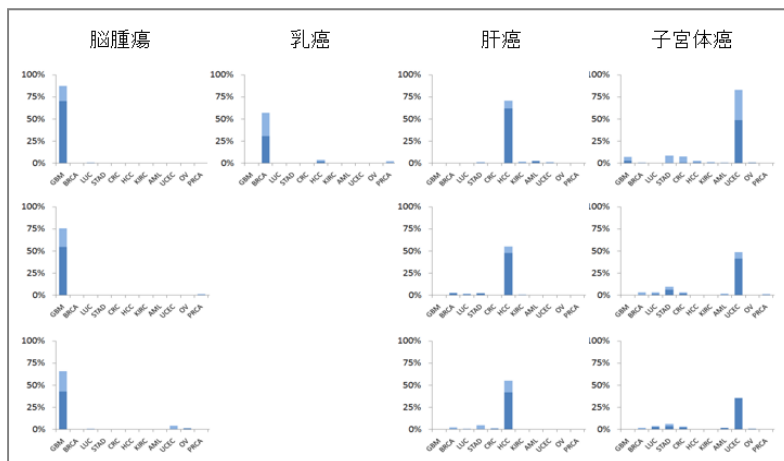
この他に、蛍光タンパク質が融合されたヒト cDNA ライブラリーを用いて、非コード RNA 依存的に形成される新しい核内構造体の探索を実施し、複数の新規な構造体 (N 構造体、S 構造体、D 構造体、C 構造体) を明らかにした。特に正常細胞では検出されないが、いくつかのがん細胞で特異的に検出される核内構造体を発見した。また、その中に阻害的なエピゲノム制御に関わる重要ながん関連因子が、RNA 依存的な新規な核内構造体形成を担っていることを明らかにした。これらの新規核内構造体の骨格となる非コード RNA を同定するために、各核内構造体のコアタンパク質の抗体による PAR-CLIP 解析を実施し、これらのタンパク質因子が結合している RNA 分子の情報をゲノムワイドに取得した。今後この情報から核内構造体の骨格 RNA を同定する予定である。

⑤ がん診断メチル化マーカーに関する研究開発

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

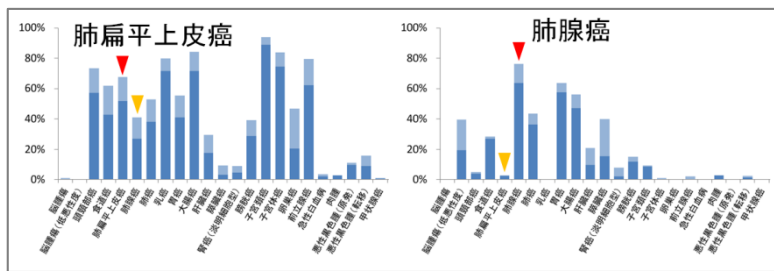


これを用いて、非がん部組織、正常組織、正常血液では検出せず、がん部組織では異常メチル化を示す CpG 領域のパネルを上図のように作成し、これらの中から陽性率の高いものを、MassARRAY 法および MSP 法で確認を行った。その結果、24 種類の癌腫特異的マーカー候補（肝がん 8 マーカー、子宮体がん 3 マーカー、大腸がん 4 マーカー、脳腫瘍 3 マーカー、肺がん 2 マーカー、乳がん 1 マーカー、胃がん 1 マーカー、卵巣がん 2 マーカー）と、9 種類の複数の癌腫で陽性となるマーカー候補で良好な結果を得たため、これらを次の段階の血液で検証する候補遺伝子とした（国内特許出願 14 件）。右上に肝がん特異的なマーカーのそれぞれの臨床組織におけるメチル化率の実例を示す。同様に、脳腫瘍、乳がん、肝がん、子宮体がんについても、非常に陽性率の高いマーカー候補を選出することができた（下図）。上記の 24 種類の癌腫特異的マーカーに関しては、非がん部組織および他癌腫でも陽性にならないものであり、これらが検出された場合にはがんの存在に加えて、

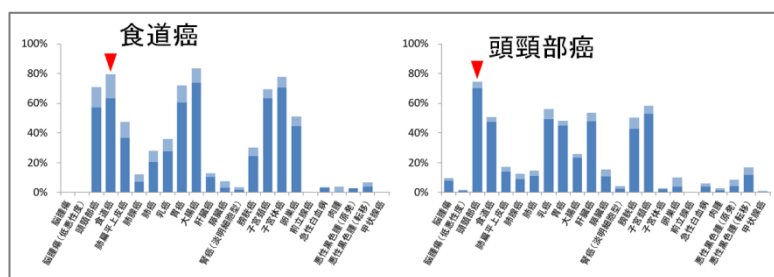


癌腫の特定を同時に行うことができる利点がある。

一方で、肺がんなどのように原発組織は同じでも病理組織学的分類によってマーカー陽性率が大きく異なる癌腫も存在した（下図）。

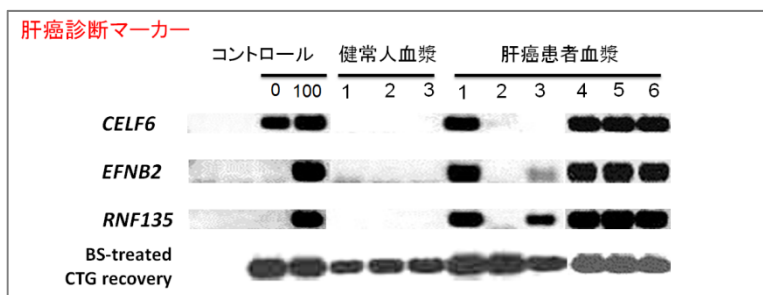


また、扁平上皮がんなどのように、原発組織は異なるものの同じ組織型を示すものは同様のパターンを示す傾向も認められた（下図）。このように、原発組織に限らず、その組織型も考慮に入れた分類を行うことで新たな血液マーカーを創出しうる可能性が考えられた。

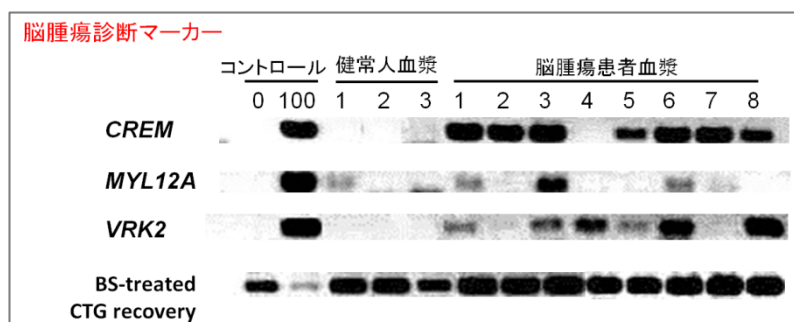


最後に、がん組織のメチル化プロファイルをもとに選出したマーカー候補を、実際にがん患者の血漿サンプルで検出できるかどうか、MSP法により確認した。

以下に示すように、肝がんで見出した3マーカーについて、いずれも肝がん患者特異的にMSP法でバンドを確認することができた。



他癌腫についても、血漿サンプルでの検証を行ったところ、脳腫瘍のようにがん組織由来の遊離DNAが非常に少ないとされる癌腫についても、MSP法で特異的なバンドを確認することができた。



⑥ がん細胞制御にかかわるエピゲノム創薬標的分子に関する研究開発

本研究開発は、新たな創薬開発の標的分子候補に対するターゲットバリデーションの一端を担うべく、様々なヒストン・DNA 修飾酵素遺伝子群に対する shRNA をデザイン・作成し、それを細胞に導入することで誘導される表現型変化のスクリーニングと、さらにはその分子メカニズムを解析することで、将来の阻害剤スクリーニングに役立つ基盤情報収集を行うものである（図 1）。

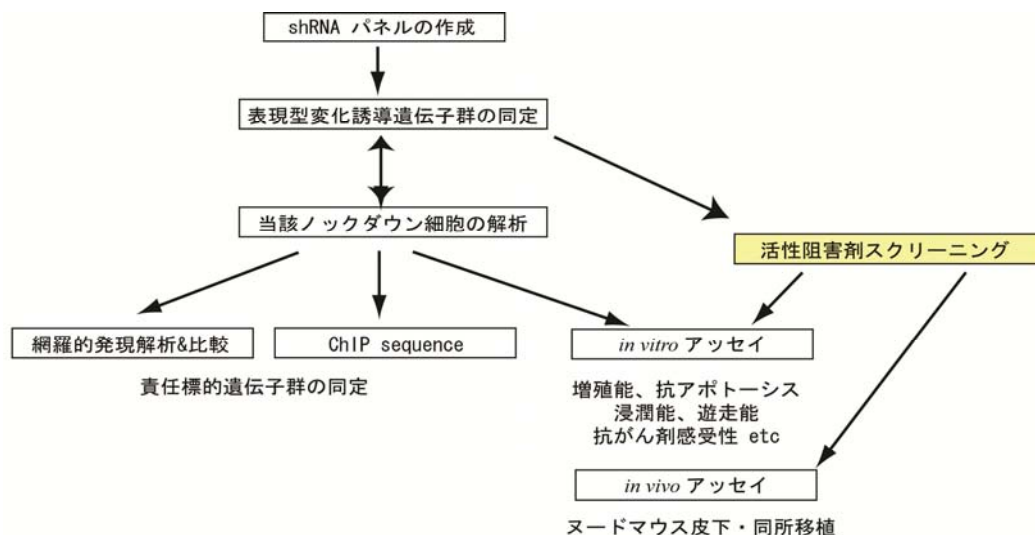


図 1

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

これまでの解析成果として、様々なヒストン修飾酵素遺伝子群が細胞の悪性度に正あるいは負の影響を及ぼしていることを見出してきた。そのうち細胞の悪性度がノックダウンによって低下する遺伝子については、治療標的候補になりうると考えている。

1) *TET* 遺伝子発現の抑制による大腸がん細胞の増殖能低下

TET は DNA のメチル化シトシンをヒドロキシル化する活性を持ち、能動的脱メチル化に関与していることから、初期発生における生物学的役割について多くの研究がおこなわれている。しかしながらがん細胞における役割についてはいまだ十分に解明されてはいない。がんにおいては遺伝子のメチル化異常がしばしば見出されるが、そのメカニズムにおける *TET* の関与もまだ明らかになってはいない。一方で、急性白血病においては *TET* 遺伝子の転座による融合遺伝子の存在も見出されており、悪性腫瘍細胞において、この分子がいかなる役割を持つか、さらには治療標的候補になりうるかどうかという点については明らかにする必要がある。

そこで、*TET* 遺伝子に対する shRNA 発現ベクターを作成し、複数の大腸がん細胞株においてそのノックダウン細胞を樹立した。コントロールとノックダウンにおいて細胞増殖速度を比較したところ、ノックダウンにより増殖抑制効果が認められた。

さらに *TET1* 遺伝子に対する shRNA 発現ベクターを導入した大腸がん細胞株をマウス脾臓に移植し、肝転移能を比較したところ、コントロール shRNA 群に比べて *TET1* shRNA 群では肝転移形成が抑制されることが示された。

また、*TET1* 遺伝子に対する siRNA を大腸がん細胞に導入した場合に異常な細胞分裂像が認められ、がん細胞の増殖抑制効果の一因と考えられた。

以上の表現型が誘導される分子メカニズムを明らかにする目的で、コントロールとノックダウン細胞との間で、網羅的な遺伝子発現解析および DNA メチル化解析を行った。遺伝子発現解析では細胞周期関連遺伝子群の発現変化が認められ、大腸がん細胞での *TET1* ノックダウンにおける細胞分裂異常の一因である可能性が示唆された。

コントロールとノックダウン細胞との間でグローバルなレベルでの DNA メチル化およびヒドロキシメチル化を検討したところ、大きな差は見出せなかった。ただ一方で Me-DIP および hMe-DIP による検討を行ったところ、発現変化をみとめた遺伝子群の遺伝子上において、ノックダウン細胞ではメチル化レベルの上昇、あるいはヒドロキシメチル化レベルの低下している領域が検出された。このことは *TET1* ががん細胞において特有の遺伝子領域におけるメチル化修飾に影響していることを示唆し、かつそれに伴う発現レベルの変化によりがん細胞の表現型を制御しうる可能性を示すものであった。

TET に対する抗原タンパク質を精製して抗体作成も進めており、ChIP-seq による標的遺伝子の検討などにも活用する予定である。

2) *KDM4C* 遺伝子発現抑制による大腸がん細胞の腫瘍形成能低下

KDM4C 遺伝子は、その増幅が食道がんや乳がんでは報告されているヒストン H3 の脱メチル化酵素 *KDM4C* をコードする。その分子が大腸がん組織の腫瘍部で高発現していることを見出し、安定ノックダウン大腸がん細胞株を樹立した。

ノックダウン細胞は *in vitro* における腫瘍形成能の低下を呈し(図2)、ノックダウン細胞に *KDM4C* を強制発現させるレスキュー実験にて腫瘍形成能が回復したことから、*KDM4C* の酵素活性の抑制が抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

また、膵がん細胞株においても同様の腫瘍形成能の低下が再現されたことから、この酵素活性の抑制が複数の癌腫で腫瘍形成能に効果をもつ可能性が示唆された。

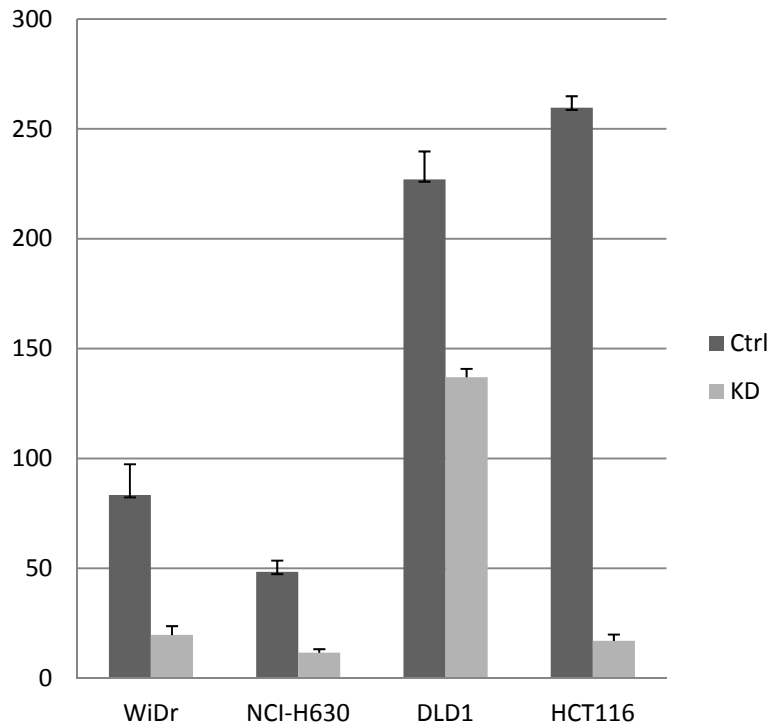


図 2 Sphere 形成能の比較

さらにマイクロアレイを用いた発現解析から、ノックダウンにより発現変化を認めるおよそ 400 遺伝子を抽出した。現在までに、それらの遺伝子の中から腫瘍形成能の低下に関連する標的遺伝子候補 JAG1 を同定しており、そのノックダウンにより腫瘍形成能の低下が再現されることを確認している。

今後も KDM4C のみならずがん治療標的候補としてのヒストン修飾酵素遺伝子群について、酵素活性測定系の構築を進める。酵素活性が得られた際には、構造解析を目的とした標的候補酵素のタンパク質大量精製に着手する。すでに標的候補タンパク質分子の構造が知られている場合は、計算科学によって阻害活性を有する低分子化合物のデザインを進めていく。

2.3. 研究開発項目③「探索的実証研究」

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

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

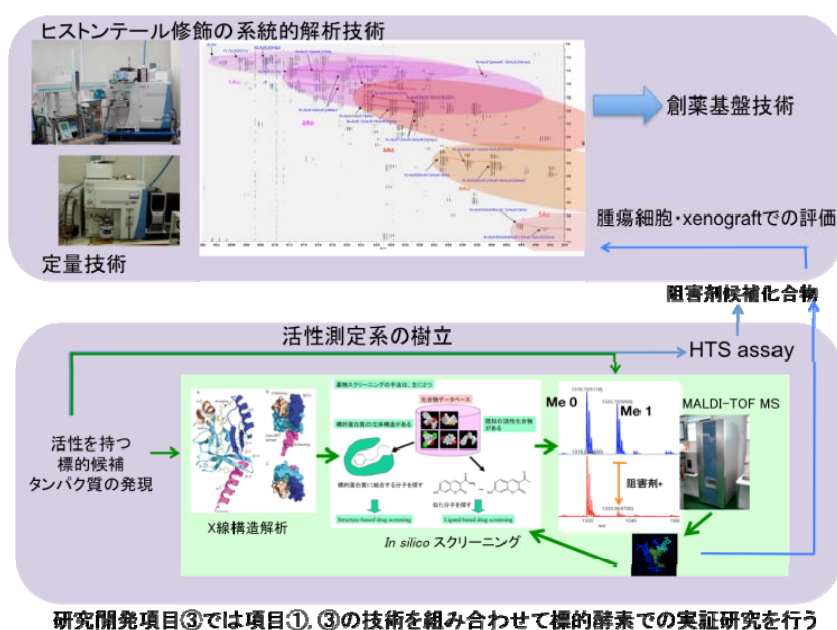


図1 研究開発項目③の流れ (36 頁図1の再掲)

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

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

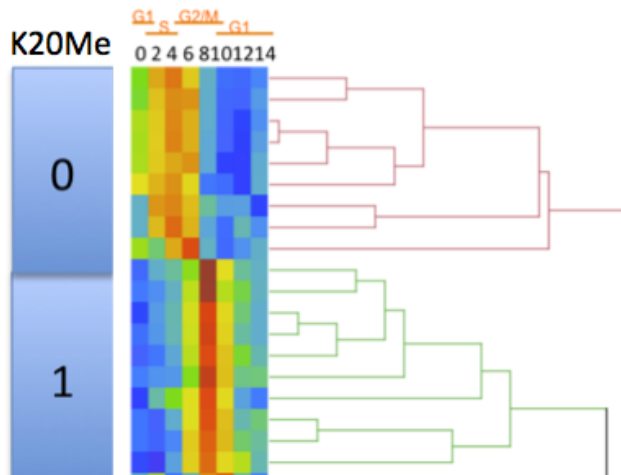


図2 細胞周期でのH4テールの修飾変化
 (K20モノメチルとメチル化無しの修飾を含む物を示している。G2/M期でモノメチルを含むH4テールの発現の上昇が見られる。)

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

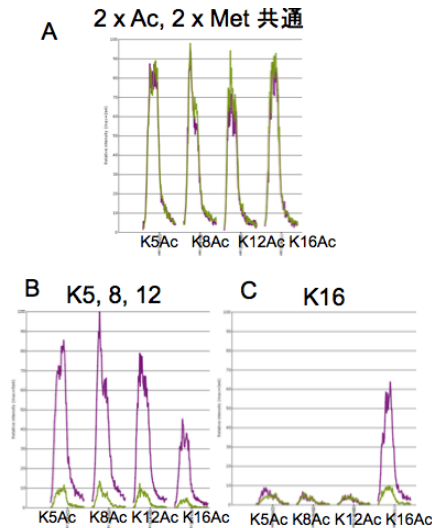


図3 SRM法による比較定量
 (K16Acを特異的に検出するトランジションが決定出来ている。)

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

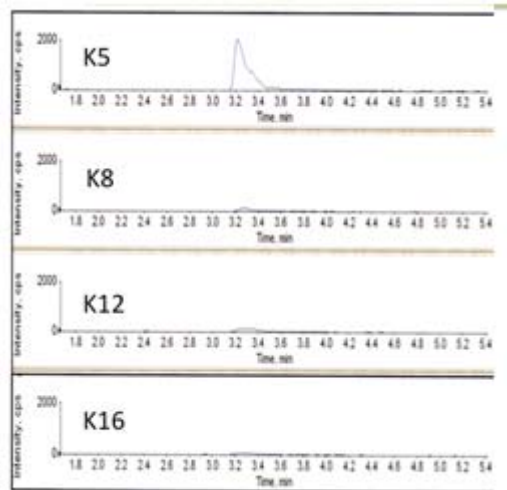


図4 イオンモビリティ法を組み合わせたSRMによるK5Ac特異的な検出

その他にも、細胞周期の解析によりいくつかの知見が得られ、新規修飾候補部位も検出された。これらについて合成ペプチドを用い検証を行っている。さらに、細胞周期によって特異的に変動するいくつかのパターンについて詳細な解析を行っており、細胞周期を制御するエピジェネティックな制御の解明を目指している。

細胞周期でのヒストンH4テールの変動解析を進めヒストンH4に帰属される100のピークを検出した。そのうちテール部分の修飾組み合わせごとの変動を解析しS期、M期に特徴的なリン酸化変動を検出した。さらに光クロスリンク法により結合タンパクの同定する技術を確認し結合タンパクを同定した。また全体の1%以下のジメチルアルギニンを含む修飾の変動を検出し現在項目①で開発した技術を用い対称か非対称修飾かの識別を行っている(図5)。今回同定されたH4テールの修飾組み合わせのうち50パターンについては合成ペプチドを作成しH4テール修飾パターンライブラリーを作成した。また本相対定量法ではLC-MSの再現性と各測定間のアライメントの精度が重要である。そこでアライメント精度の向上と絶対定量を行うためヒストン由来のペプチドを含む24ペプチドについて安定同位体ラベルペプチドを合成した。これを用いることでアライメント精度と定量性の向上が期待される。またこの安定同位体ペプチドはSRMによる絶対定量にも使用可能であり今後条件検討を続ける予定である。

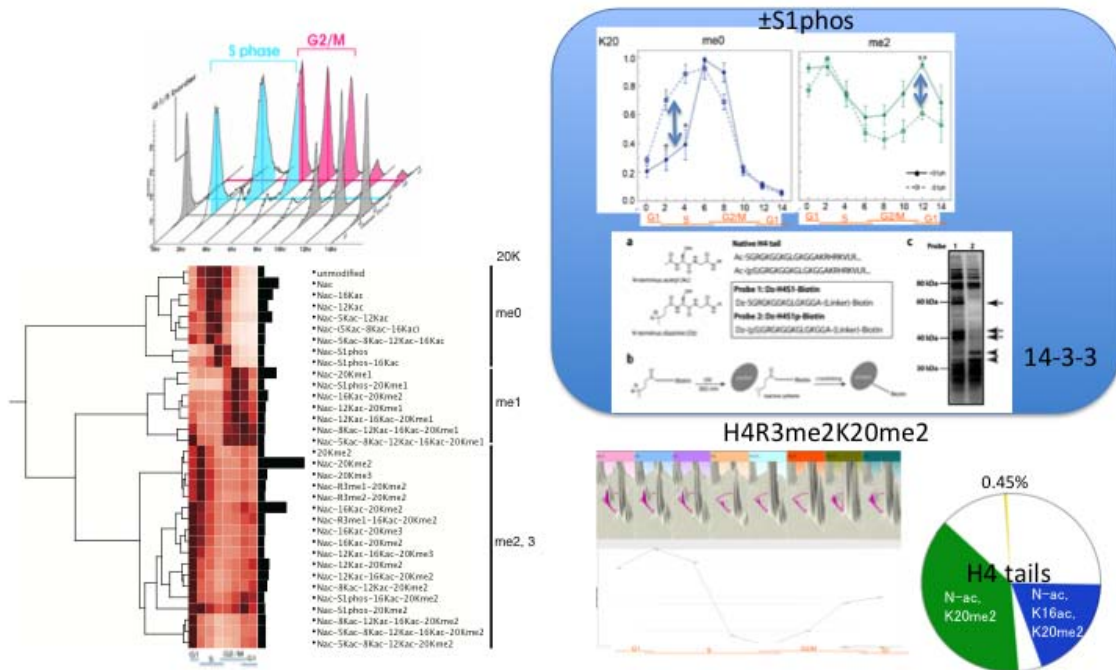


図5 細胞周期でのヒストンH4 テール修飾パターンの変動と相互作用タンパク質の同定

エピゲノム関連酵素のアッセイ系については標的11分子中9分子について活性測定が可能になった。そのうち阻害剤スクリーニングに進んだ物は6標的である。新規標的としてDNA脱メチル化酵素EPI07についてELISAベースと時間分解蛍光共鳴エネルギー転移(TR-FRET)のアッセイ系を構築した。これまでの標的についてもPR-SET7ではLC-MS, アルファスクリーニング、TR-FRETでのアッセイ系を確立した。TR-FRETの系はG9a, jmjd1aについても確立した。Jmjd1aとEZH2, EPI05についてはMALDI-TOFMSで十分な感度が取れなかったためLC-MSでのアッセイ系も構築した(表1)。

標的分子	確立した活性測定法	スクリーニング手法	進捗状況
PR-SET7 (H4K20メチル化)	MALDI-TOFMS LC-MS α-screening TR-FRET	<i>in silico</i> , <i>in vitro</i> ペプチドライブラリー	2nd hit化合物との共結晶 活性評価・絞り込み 培養細胞での評価系の樹立
G9a (H3K9メチル化)	MALDI-TOFMS TR-FRET(評価中)	<i>in silico</i> , <i>in vitro</i>	2 nd <i>in silico</i> screening
EZH2 (H3K27メチル化)	α-screening LC-MS	天然物ライブラリー	細胞での評価系の樹立 10万化合物の追加スクリーニング
JMJD1A (H3K9脱メチル化)	MALDI-TOFMS LC-MS TR-FRET	天然物ライブラリー	二次評価・化合物の絞り込み 追加スクリーニング
EPI05 (メチル化)	radioisotope assay LC-MS	<i>in silico</i> , <i>in vitro</i> ペプチドライブラリー	細胞での評価・共結晶化 活性評価・絞り込み
EPI07 (脱メチル化)	Antibody (ELISA) TR-FRET(評価中)	ペプチドライブラリー 天然物ライブラリー	活性評価・絞り込み スクリーニング準備中

表1 標的分子の活性測定手法とスクリーニング状況

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

(2) 探索的実証研究

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

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

活性測定にはMALDI-TOFMSを用いた。MALDI-TOFMSでは測定が簡便で迅速にペプチドの正確な質量情報が得られるため、メチル化の量やメチル基導入数が正確に分かる。また同時に、MS/MS解析を行えるので、メチル化されたアミノ酸部位の解析も行える。MALDI-TOFMSで活性が検出出来ない比較的活性が弱いものについては、高感度な活性検出のために放射性同位体 (RI) ラベル法を行った。その他にELISA法、高感度・ハイスループットスクリーニングを目指し、 α -スクリーニング法の構築も行った。標的分子に結合して活性を制御する分子を探索するために、*in silico*、MALDI-TOFMSによる*in vitro*スクリーニングを組み合わせ手法、天然物ライブラリースクリーニング、非天然ペプチドスクリーニングを展開している (表2)。

表2 これまでに樹立したアッセイ系

標的分子	活性測定法	スクリーニング手法
PR-SET7(H4K20)	MALDI-TOFMS	<i>in silico, in vitro</i> ペプチドライブラリー
G9a (H3K9)	MALDI-TOFMS	<i>in silico, in vitro</i>
EZH2 (H3K27)	α -screening	天然物ライブラリー
JMJD1A (H3K9脱メチル)	MALDI-TOFMS	
EPI05 (ヒストンメチル化)	autoradiography	<i>in silico, in vitro</i> ペプチドライブラリー

これまでに、当初計画のPR-SET7, G9a, EZH2, JMJD1A, EPI05の5標的について以下の結果が得られている。

1) PR-SET7

ヒストンH4K20モノメチル化酵素。白血病細胞株K562でsiRNAによりPR-SET7の発現抑制を行うと、巨核球への分化が促進されることが報告されている。また、前述したように、H4K20me1修飾は細胞周期G2期後期に上昇することが知られており、細胞周期での複製起点での役割が注目されている。PR-SET7は既に結晶構造が報告されていたため、大腸菌を用いてeXact-Tag精製システムにより精製タンパク質を調製し活性測定系の確立を行った。PR-SET7の活性中心であるSETドメインを用いて活性なタンパク質が得られ、MALDI-TOFMSでの活性測定を行った (図6)。

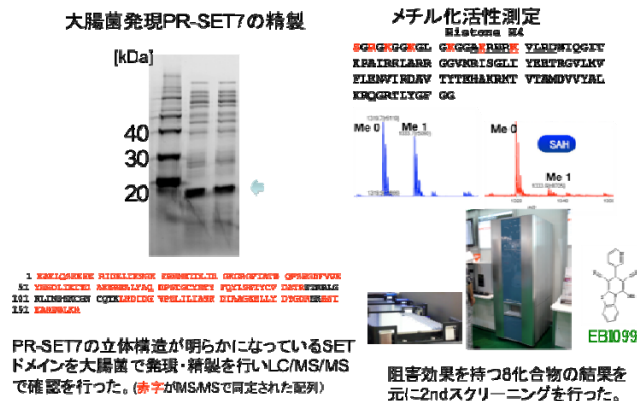


図6 PR-SET7のアッセイ法の構築

次に、標的タンパク質の構造情報を利用したStructure-based drug screeningと、既知活性化合物情報を利用したLigand-based drug screeningを組み合わせた*in silico*スクリーニングを行い、候補化合物を選択した(図7)。

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

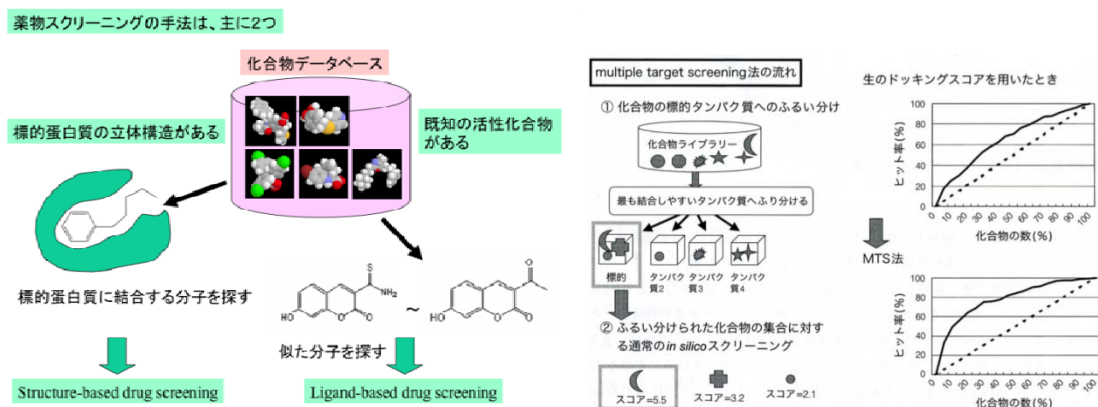


図7 *In silico*スクリーニングの概略(左)とMTS法の概念(右)

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

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

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

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

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

これにより約 200 化合物まで絞り込みを行い、複数のヒット化合物が得られた。この中で最も阻害活性が高かった EBI099 は、白血病細胞株 K562 に細胞老化を誘導した (図 8)。

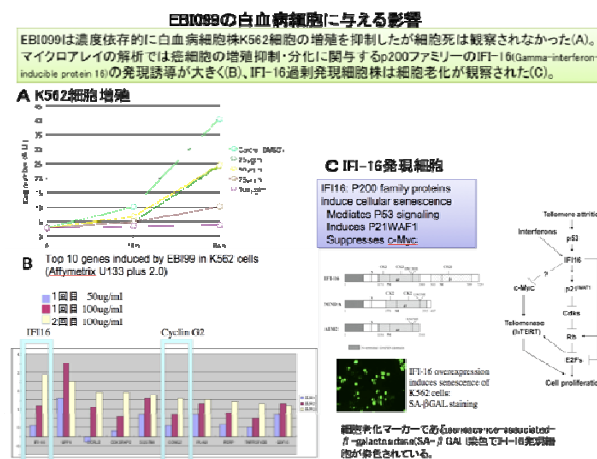


図 8 1st スクリーニングで得られた化合物の培養細胞での評価

しかしながら、EBI099 は高濃度でなければ細胞に効果がなかったため、より特異的な化合物を得るために、DSI 法を用いたドッキングシミュレーションによる類似化合物探索法も併用した 2nd *in silico* スクリーニングを行った。その結果、2nd スクリーニングではほとんどの化合物が 1st スクリーニングで使用した 100 μg/ml の濃度で阻害活性を示し、さらに 50 倍の阻害活性を持つ化合物が複数得られた。化合物と酵素蛋白の共結晶化を試み、1 化合物で結晶化に成功した (図 9)。現在、その化合物について、検証実験として、候補化合物投与時の培養細胞株の H4 テールの修飾解析および細胞増殖に及ぼす効果を検討している。

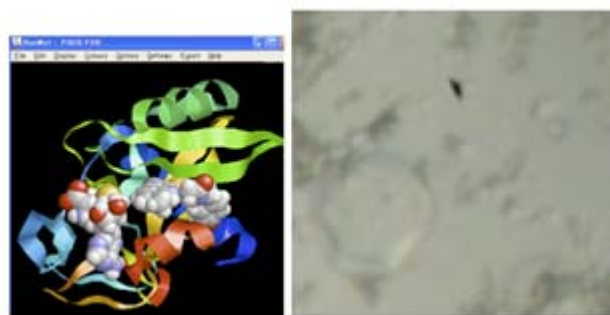


図 9 2nd スクリーニングで得られた化合物と SAH、PR-SET7 のドッキングシミュレーション構造 (左) と共結晶 (右)

またPR-SET7についてはあらたなスクリーニング手法として抗体のレパートリーを超える10の12乗のレパートリーを持つ非天然結合ペプチドライブラリースクリーニングも行っており候補配列が得られている（図10）。

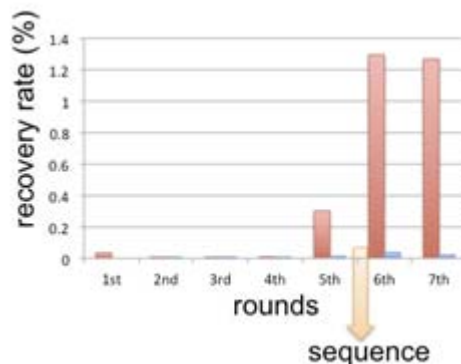


図10 結合ペプチドスクリーニング
 (パンニング回数5回目でシーケンスを行い30ペプチドを得ている。PR-SET7では免疫沈降に適した抗体が得られていないため新規に抗体作成にも着手している。)

2) G9a

ヒストン H3K9 メチル化酵素として知られる、がんの治療、iPS 細胞の誘導促進への可能性を持つ分子であり、既に構造解析も行われているので、PR-SET7 と同様に、活性を持つタンパクを発現・精製し、化合物の *in silico*・*in vitro* スクリーニングを実施し複数の化合物が得られた（図 11）。G9a とヘテロダイマーを形成するヒストン H3 メチル化酵素 GLP を用いて G9a に対する特異性の解析を行うために、GLP 発現系の構築を行っている。現在、*in silico*・*in vitro* スクリーニングによって得られた候補化合物の評価を行い、2nd スクリーニングを行うかの検討を行っている。スクリーニングで得られた活性化化合物について、がんの治療、iPS 細胞の誘導促進への可能性を検討する。

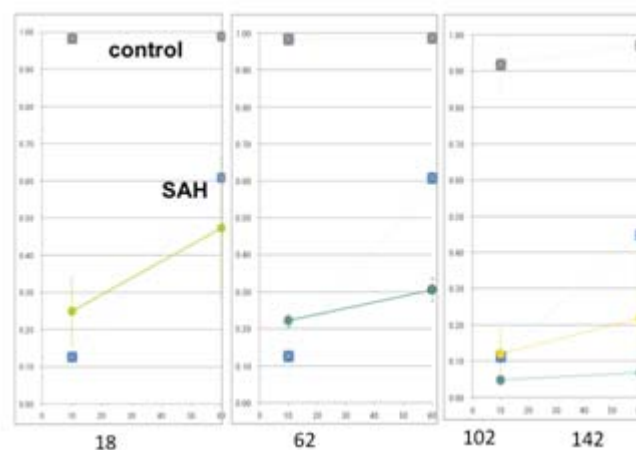


図11 G9a阻害剤スクリーニング (G9aを阻害する4化合物が得られている。)

3) EZH2

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

可能である。

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

これまでに活性タンパク質の発現精製と *in vitro* アッセイ系の最適化、構造解析のための大量タンパク質の調製を行っており、昆虫細胞を用いた発現系で活性のある酵素複合体が得られている。*In vitro* スクリーニングに用いるさらに高活性なタンパク質複合体を取得するために、ヒト培養細胞 293F を用いた発現系も構築した。X 線構造解析を行うために、バキュロウイルスを用いて PRC2 複合体を構成する EZH2, EED, SUZ12 を Sf9 に発現させる系を作製し精製を行ったが、十分な量が得られなかった。しかし、この複合体を抗体作成に用いることで、EZH2, SUZ12, EED を免疫沈降可能なモノクローナル抗体が得られた (図 12)。現在、プロテオミクスにより複合体解析を行い、新規または疾患特異的な構成成分を探索するための条件検討を行っている。

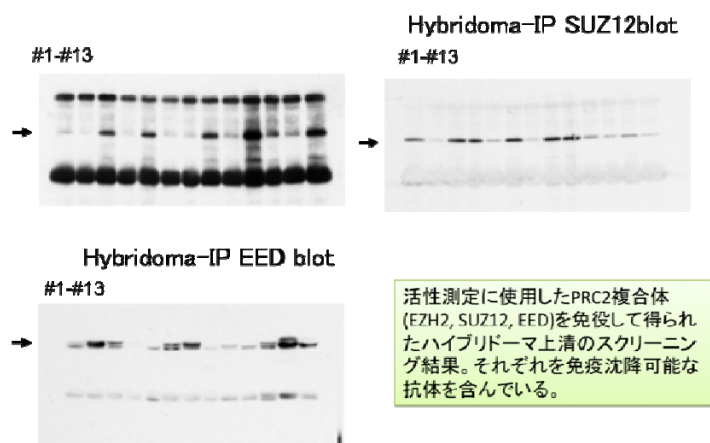


図 12 EZH2, SUZ12, EED 抗体のスクリーニング

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

参加企業においても、293F 細胞を用いた発現系から精製したタンパクを用いて ELISA 検出系を構築し、市販の PRC2 より高い活性を持つことが確認できた。このタンパク質を用いて α -スクリーニング法による 18,000 の化合物について阻害活性スクリーニングを行っている (図 13)。

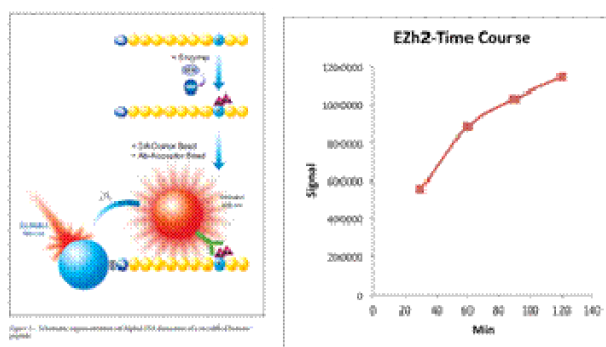


図 13 α -スクリーニング法による EZH2 の活性測定のタイムコース

4) JMJD1A

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

JMJD1A の全長発現タンパクを用いて、メチル化ヒストンペプチドの脱メチル化活性を検出した。現在、化合物スクリーニングを行うためのアッセイ系を構築中である。参画企業においても複数の手法でスクリーニング系を構築しており、それを用いて参画企業が保有する 10,000 個程度の化合物ライブラリーを用いたパイロットスクリーニングによる活性評価を検討中である。得られた活性化化合物について、細胞レベルでのヒストン修飾などエピゲノムに与える作用を検討するとともに、腫瘍血管に対する増殖抑制効果を観察して生体内での効果を立証する予定である。

5) EPI05

研究開発項目②で探索された新規標的分子 EPI05 に対し、先行標的と同様に精製タンパク質を用いた活性測定系の構築、構造解析のためのタンパク質大量調製、*in vitro* ハイスループットスクリーニング系の樹立、抗体作成を行っている。これまでに RI を用いた活性測定系を確立した。EPI05 は、その後構造解析のデータが発表されたため、その構造を基にして *in silico* スクリーニングを行い、阻害剤候補として 200 化合物を得た。そのうち購入可能な 163 化合物の RI アッセイを行い、SAH より阻害活性が高いものを得ている。現在、PR-SET7 と同様にペプチドライブラリースクリーニングを行っている。

6) EPI06

EPI06 は H3K36 をジメチル化するヒストンメチル化酵素であり、long form (EPI06L) と short form (EPI06S) が存在する。EPI06S には SET ドメインがなく機能未知である。EPI06 は乳がんや肺扁平上皮がん、食道がんで遺伝子増幅が報告されており、遺伝子増幅している乳がん細胞株で EPI06 を KD するとアポトーシスが誘導される (先行文献および先端研データ)。一方、正常乳腺細胞株 (MCF10A) に EPI06S または L を発現させると細胞が異常増殖することが報告されている。エクソナーレイ (図 14) でも乳がん (主にホルモンレセプター陽性例) や肺扁平上皮がんなどで発現がみられ、特に肺扁平上皮がんでは 4/14 例(29%)で EPI06 の発現が亢進し、一部では short form が主に発現していた (図 15)。

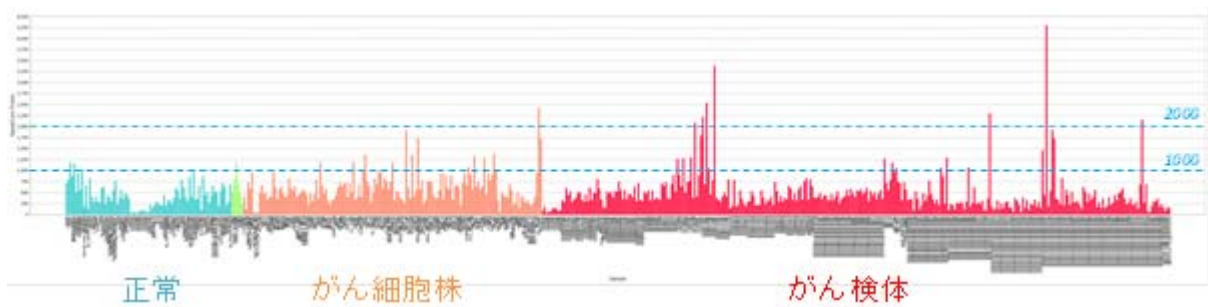
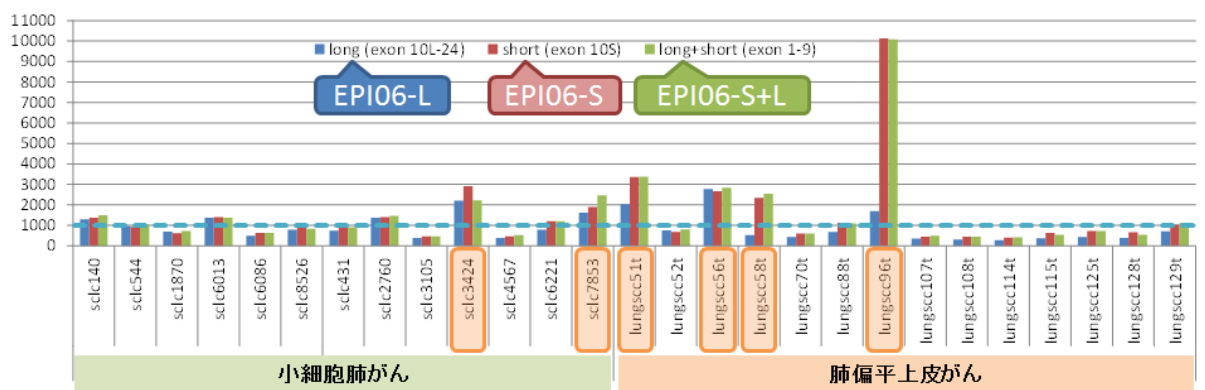


図 14 EPI06 遺伝子のエクソンアレイ解析による発現プロファイル



(ExonArray, 正常組織における発現は概ね500-1000)

肺扁平上皮がん組織型

Well differentiated: -
 Moderately differentiated: 56t*, 88t
 Poorly differentiated: 51t*, 52t, 58t*, 70t, 96t* (basaloid type), 129t
 Not shown: 107t, 108t, 114t, 115t, 125t, 128t

図 15 肺扁平上皮がん：組織形と EPI06 発現

エクソンアレイで確認されたショートバリエント (EPI06S) の発現量は real time-PCR で解析した。EPI06 の蛋白での発現を確認するためにはショートバリエントを特異的に認識する抗体が必要であり、EPI06 の 621-644aa に KLH を結合させたペプチドを免疫してモノクローナル抗体を取得した。抗体は最も感度および特異性の高いクローン B1 (EPI06S 特異的) を用いることにした。取得した抗体を用いた IHC 解析は東大人体病理に依頼した。肺がん (各種組織型)、大腸がん、腎がん、乳がん (US Biomax 社製市販 TMA、2 種類)、食道がん (US Biomax 社製市販 TMA、1 種類)、肝がん、膀胱がん、CML の IHC 解析を実施した。クローン B1 による代表的な染色像を示した (図 15)。いくつかの検体では細胞質にも染色が観察されたが、EPI06 は主に核内に局在すると思われることから核における染色強度についてスコア化を行った。マイクロアレイデータと同様に、肺がんや食道がんでは扁平上皮がんが発現が高く、乳がんでは ER 陽性例で発現が高かった (表 3)。

BR10010a (breast tumor TMA)					
	+++	++	+	-	total
ER+ sample	7 (22%)	3 (9%)	10 (31%)	12	32 (100%) (NSD3S+ total 63%)
ER- sample	0 (0%)	3 (4%)	11 (16%)	53	67 (100%) (NSD3S+ total 21%)

ES482 (esophageal tumor TMA)					
	+++	++	+	-	total
squamous	2 (8%)	11 (44%)	8 (32%)	4	25 (100%) (NSD3S+ total 84%)
adenoca	1 (11%)	1 (11%)	0 (0%)	7	9 (100%) (NSD3S+ total 22%)
small cell ca	0	0	1	0	1
ca sarcomatodes	0	0	0	1	1
normal	0 (0%)	0 (0%)	3 (43%)	4	7 (100%) (NSD3S+ total 43%)

Lung adeno ca (number, (%))					
	+++	++	+	-	total
Clone B1	0 (0%)	3 (7%)	9 (21%)	31 (72%)	43 (100%)
Clone B15	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	22 (96%)	23 (100%)

Lung squamous ca (number, (%))					
	+++	++	+	-	total
Clone B1	7 (20%)	10 (29%)	8 (23%)	10 (29%)	35 (100%)
Clone B15	3 (14%)	1 (5%)	2 (10%)	15 (71%)	21 (100%)

表3 乳がん、食道がん、肺がん TMA の染色結果まとめ

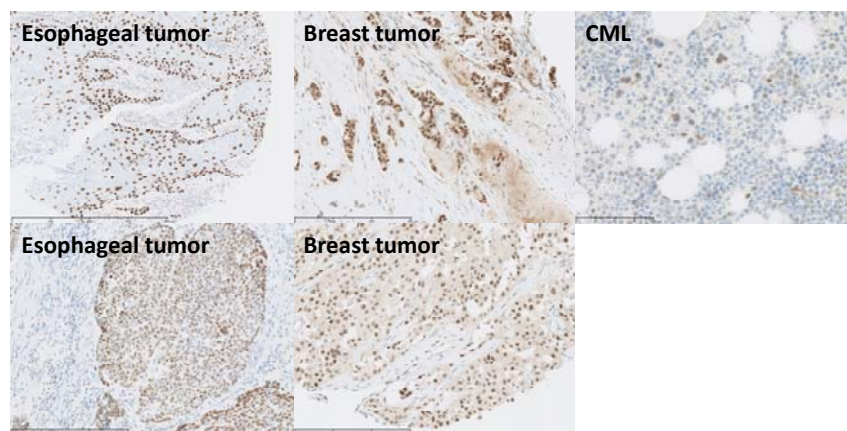


図15 抗NSD3S抗体クローンB1を用いたIHCの例

がん細胞での EPI06 を siEPI06 による KD することでアポトーシスが誘導されるデータの裏付けを取るために EPI06L と EPI06S を 2A 配列で連結したコンストラクト (EPI06-LS) を発現する MFM223 細胞を用い、siRNA のレスキュー検討を行ったが、レスキューは確認されなかった。EPI06 遺伝子は FGFR1 遺伝子の極めて近傍に位置し両株は NSD3 と FGFR1 が共に遺伝子増幅されており、また両株とも FGFRi PD173074 に感受性であることが知られている。従って EPI06 は oncogene ではなく passenger amplification である可能性が考えられた。H520 細胞株でも MFM223 細胞株でもレスキューが認められなかったことにより siEPI06 による細胞増殖阻害は off target であった可能性が考えられ、テーマを終了した。

7) EPI07
(詳細後述)

8) EPI08
(詳細省略)

9) EPI09

新規標的分子ヒストンメチルトランスフェラーゼ EPI09 はエクソアレイデータのマイニングにより精巣がんで高発現し、正常組織での発現が ES 細胞に局限していることから副作用の懸念が低い標的分子として期待された。本分子は、PR ドメインを有し、発生学の方野では始原生殖細胞のマーカ―遺伝子として有名であり、乳がんにおいて、**gene amplification** の報告 (Cancer Res 2007; 67: 9649-9657) があるが、油谷研と未来研共同で取得したエクソアレイデータの乳がんサンプルのデータでは高発現検体は無い。

この酵素の基質は未同定であり、基質を同定することを目的として、293F で発現させたヒト PRDM14-Flag 蛋白質のタグ抗体で共沈される蛋白質を MS 解析した結果、Histone H2A、H2B、H3 が含まれていることが判明し、Histone H2A、H2B、H3 がヒト PRDM14 の基質である可能性が考えられた。

論文で報告されている乳がんでの発現を確認し、精巣がん以外の標的がん種について免疫染色で評価するために抗体の取得が必要であった。EPI09 蛋白質 Flag を 293F 細胞で発現、精製したものを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。抗体の作製は、(株)特殊免疫研究所に外注した。得られたモノクローナル抗体は、GST 融合蛋白との反応性から 3 種類のエピトープに対する抗体が取得できた (図 16)。

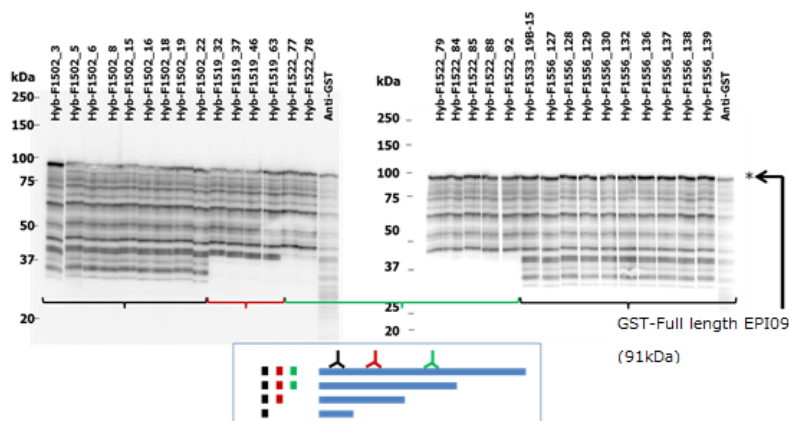


図 16 ハイブリドーマ上清を用いた GST-EPI09 蛋白の反応性の WB による解析

F1553-19B-15 を用いて様々ながん種について東大人体病理で市販の TMA などで染色、評価を依頼した。精巣がん 28 症例中 12 症例で陽性を示し、精巣の胎児がん極めて特異性が高いマ―カ―であることを確認した (図 17)。一方、卵巣腫瘍 246 例、子宮頸がん (正常を含む) 96 例、乳がん 110 例、膀胱がん 8 例、腎がん 8 例、肺扁平上皮がん 24 例、肺腺がん 48 例、肺小細胞がん 80 例、肺大細胞がん 80 例、大腸がん 42 例、全てにおいて陰性であった。

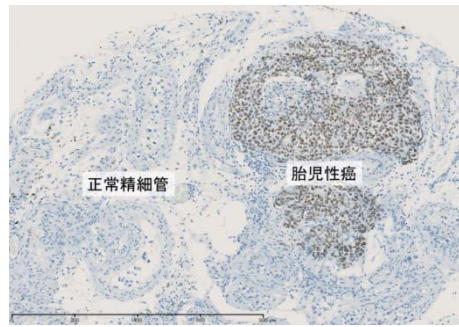


図 17 抗 EPI09 モノクローナル抗体、F1553-19B-15 を用いた免疫組織染色結果
(東大人体病理と共同で実施)

精巣がん以外の癌腫においてマイナーな population の細胞、例えば CSC などが発現していることを期待してわずかながらも発現アレイでシグナルが見られた癌腫を中心に免疫染色により標的癌腫を探索したが、残念ながら精巣がん以外では発現を確認できなかった。精巣がんでは市場性が小さいことからテーマは中止とした。

10) EPI10

EPI10 はアセチル化リジンを認識して結合する bromodomain を有するタンパク質であり、酵素活性はこれまでに報告されていない。Bromodomain を有するタンパク質は、酵素活性はないものの特定の酵素を特定の領域にリクルートする性質があると考えられ、bromodomain を有する BRD4 は有望な創薬標的として阻害剤の開発が進んでいる。EPI10 はエクソンアレイ解析の結果、EZH2 と同程度の腫瘍特異性があり、また IHC の結果 EZH2 と共発現すると報告されている。また EPI10 の KD によりがん細胞の増殖が抑制されるという報告もなされていることから有望な標的である可能性がある。さらに近年 HMT のようなヒストン修飾を入れる酵素だけではなく、特定の領域を認識する「reader」の重要性が示唆されており、酵素以外の創薬の可能性を見極めるという点からも EPI10 を評価した。

市販されている Anti-EPI10 抗体を購入し WB の検討を実施したが使用できる抗体は入手できなかった。MBP-EPI10(1159-1301)-His(大腸菌発現)を免疫し、EPI10(1159-1301)-His (HEK293F 発現)を用いて ELISA によりスクリーニングを実施した。得られた抗体で WB を実施した結果、ほぼすべてのクローンが WB に使用でき、特異性も良好であった。

EPI10 は細胞での発現に苦労したが、論文でアデノウイルスでの発現が報告されていることからエピゾーマルベクターを試したところ良好な発現が得られた。

EPI10 の siRNA による mRNA レベル、タンパク質レベルの KD を qPCR と取得した anti-EPI10 抗体を用いた WB で確認するとともに、細胞増殖抑制の解析をした (図 18)。その結果、mRNA、タンパク質ともに良好に KD できていることが確認されたものの、細胞増殖抑制は認められなかった。このことから、過去の報告は off-target 効果によるものと考えられた。EPI10 を siRNA もしくは shRNA により KD することで colony 形成能を減弱するという報告も複数なされているが (Cancer Reserch 70(22) Nov. 15, 2010 9402-9412, Cancer Reserch 69(21) Nov. 1, 2009 8491-8498)、siRNA を用いて KD した場合において colony 形成能の抑制は確認できなかったことから EPI10 は中止とした。

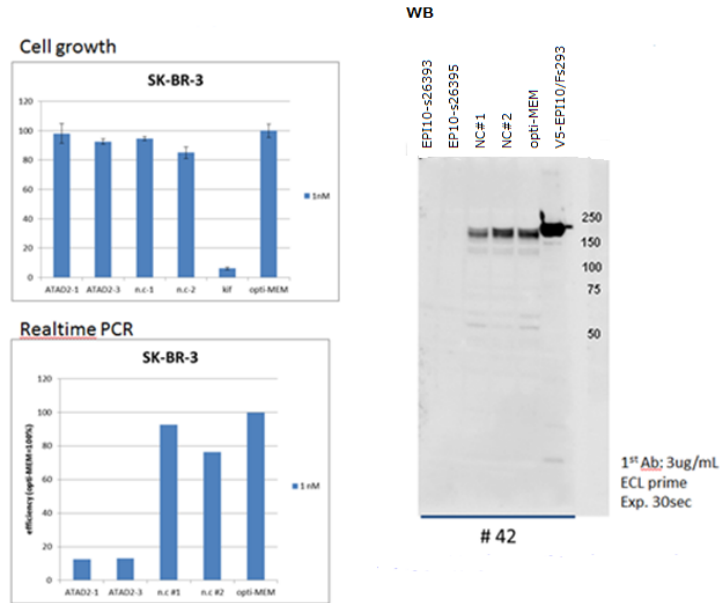


図 18 siRNA を用いた SK-BR-3 における EPI10 の KD 確認実験

PR-SET7については2ndスクリーニングでヒットした化合物との共結晶化を試み構造解析ができペプチドを含まない状態での結晶化は初めての報告であったが、化合物を含まずに結晶化していたことが明らかになり再度、共結晶化を進めている。PR-SET7ではin silicoで最初に行ったMyPrestoによるMultiple target screening (MTS)法とDocking score index (DSI)以外にヒット化合物の類似化合物探索にOpenEyeをつかった手法、京をもちいた分子動力学計算による手法も用いてメチル化活性阻害化合物を得た。また東京大学菅研究室との共同研究によりRaPID法による環状ペプチドライ

ブラリースクリーニングも行いヒットペプチドを得たがIC50はどれも μ Mレベルであった(図19,20)。

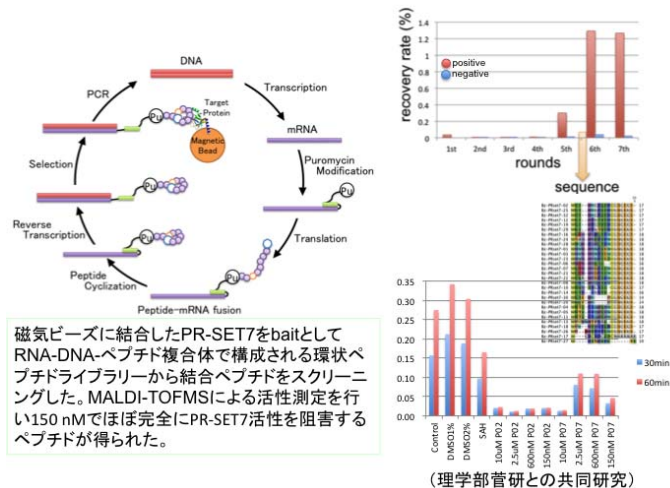


図 19 環状ペプチドライブラリースクリーニングによる Pr-SET7 阻害剤の探索

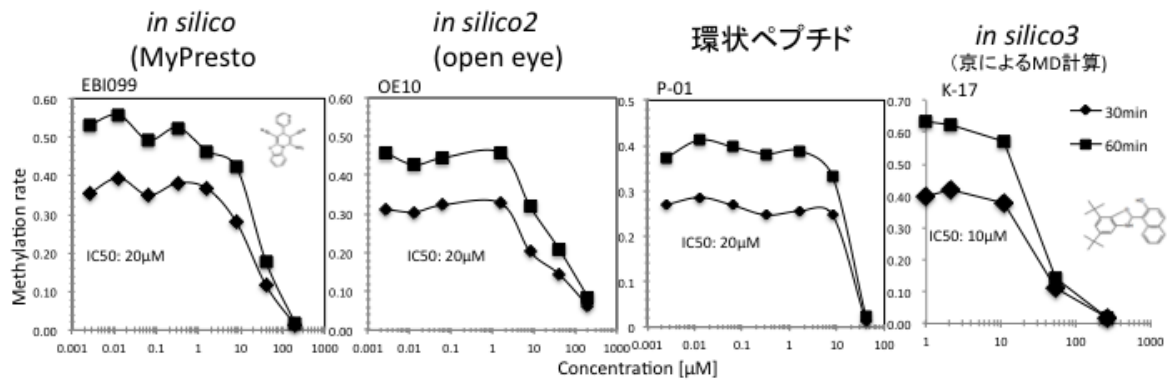


図 20 各種スクリーニング法によりヒットした PR-SET7 阻害剤

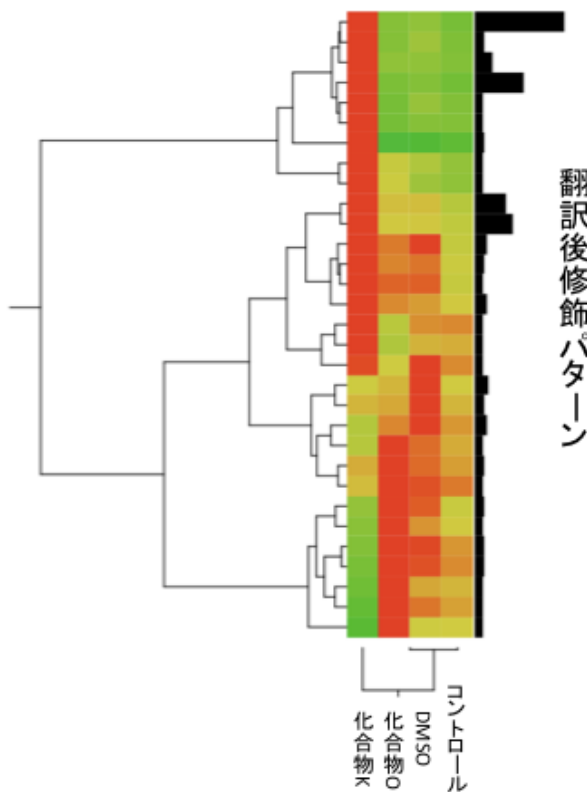


図 21 HeLa 細胞へ添加した化合物によるヒストン H4 テール修飾パターンの変動

EZH2 については理研の約 2 万の天然物ライブラリースクリーニングを行い 90%以上活性を抑える化合物が 100 以上ヒットした。そのうち EZH2 への特異性が高いと考えられる 24 化合物について LC-MS での検出系と培養細胞を用いた評価系を確立し検証を行ったがヒット化合物は得られなかった(図 22)。現在 *in silico* スクリーニングおよび、東大の 10 万化合物のスクリーニングを行い新たな化合物の探索を行っている。これまでアルファスクリーニングでヒットし LC-MS での検証でも阻害活性がある化合物を得ておりスクリーニングを継続している。また EZH2 については抗体の作成を行い特異性が高くウェスタンブロットと免疫組織染色に使用できるものが作成できた。

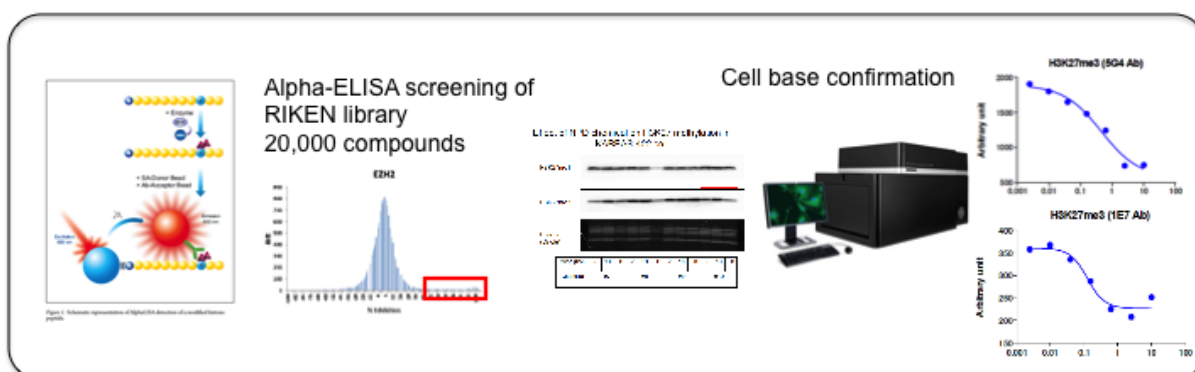
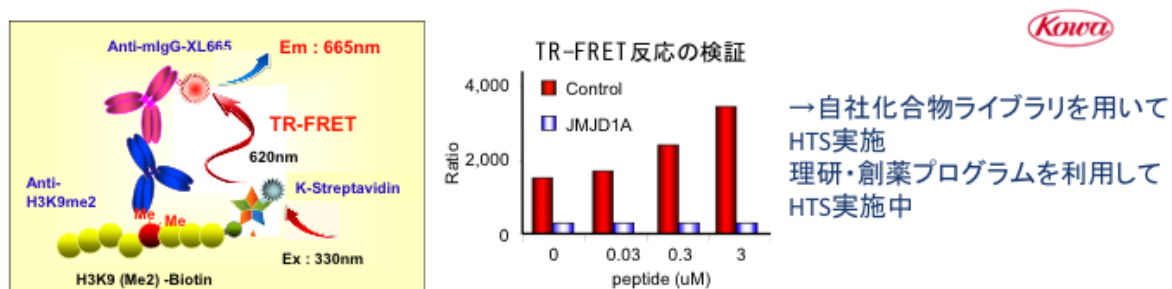


図 22 アルファスクリーニングによる天然物ライブラリースクリーニングと細胞ベースの検証

Jmjd1a は TR-FRET の系を確立し理研の 2 万の天然物ライブラリー、興和株式会社の化合物ライブラリー、東京大学の 10 万化合物のスクリーニングが終わり複数のヒット化合物が得られている (図 23)。これらについて MALDI-TOFMS での検証を行い阻害活性が認められて物については合成展開を進めている。

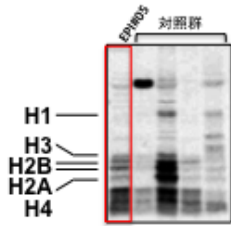


脱メチル化によりFRET蛍光量低下。阻害剤は低下を回復。

図 23 TR-FRET による jmjd1a アッセイ系の確立とライブラリースクリーニング

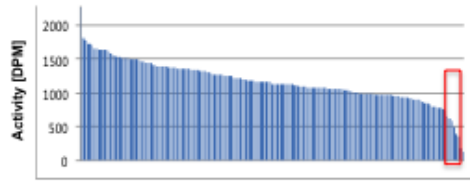
EPI05 については本事業中に構造が報告されたのでその構造を用い in silico スクリーニングを行いラジオアイソトープを用いたアッセイ系で 163 化合物のスクリーニングを行った。そのうちの阻害活性が高かった 3 化合物の構造を元に 2nd スクリーニングと共結晶化を行っている (図 24)。また PR-SET7 と同様 RaPID 法による環状ペプチドスクリーニングも行い結合するペプチドが得られたが阻害活性は認められなかった。

HMTaseアッセイ



EPI#05によりH3、H4などがメチル化されたことを確認した。

阻害剤スクリーニング



168化合物中数化合物が酵素活性を強く阻害した。うち3化合物(A1, A3, A4)について再現性が確認された。

阻害剤の濃度依存性の確認



IC₅₀ = 1-20 μM

結晶構造解析(阻害剤A1との複合体)

単結晶、小さいので最適化が必要
AdoHcyのみ加えた時には見られなかった形の結晶
モスキートでのみ再現性確認
約10 Åでスポット確認 (in Photon Factory)

(阪大井上研究室 溝端らとの共同研究)

結晶化条件

タンパク質濃度 : 10 mg/ml
Buffer : 20 mM Tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl
1 mM DTT
沈殿剤 : 25% w/v PEE797
100 mM Tris pH 8.5
添加剤 : 600 μM 阻害剤A1 in DMSO
結晶化法 : Sitting Drop
ドロップ量 : タンパク質溶液 : 沈殿剤 = 0.1 μl : 0.1 μl
結晶化温度 : 4°C
結晶化Plate : Viola plate

図 24 EPI05 阻害剤スクリーニングとヒット化合物との共結晶化

新規標的の EPI07 については構造解析のための大量培養を行い結晶化を試みている。また環状ペプチドライブラリースクリーニングから酵素活性阻害効果をもつペプチドを得ている。TR-FRET によるアッセイ系を構築し産総研のライブラリースクリーニングに着手している (図 25,26)。

遺伝子発現

shRNAによるノックダウン

HepG2 (ヒト肝癌由来細胞株)

Huh7 (ヒト肝癌由来細胞株)

EPI#07ノックダウン細胞では、細胞増殖関連遺伝子の発現が低下

Name of Gene set [C2, canonical pathways]	SIZE	NES	NOM p-val	FDR q-val
REACTOME_G1_S_TRANSITION	54	-2.005	0.115	0.099
REACTOME_S_PHASE	57	-1.909	0.000	0.288
REACTOME_DNA_REPLICATION_PRE_INITIATION	38	-1.899	0.115	0.228
REACTOME_M_G1_TRANSITION	31	-1.898	0.118	0.184
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	45	-1.895	0.000	0.157
KEGG_CELL_CYCLE	70	-1.885	0.000	0.140
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	142	-1.874	0.000	0.148
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	57	-1.873	0.114	0.136
REACTOME_MITOTIC_M_M_G1_PHASES	69	-1.868	0.000	0.131
REACTOME_ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	31	-1.859	0.118	0.128

EPI#07酵素活性阻害ペプチドの同定

分子量マーカー

リコンビナント EPI#07

阻害剤なし

EPI#07結合ペプチド

#1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9 #10 #11 #12

EPI#07リコンビナントタンパク質を基質と反応させ、反応産物を抗体を用いて検出した。ランダムペプチドライブラリーからアフィニティ選択により得られたEPI#07結合ペプチドのいくつかは酵素活性を強く阻害した。

図 25 新規標的候補遺伝子 EPI07

HTRF (時間分解蛍光測定法)によるEPI07 活性測定系の確立(セティ・メディカルラボと共同開発)

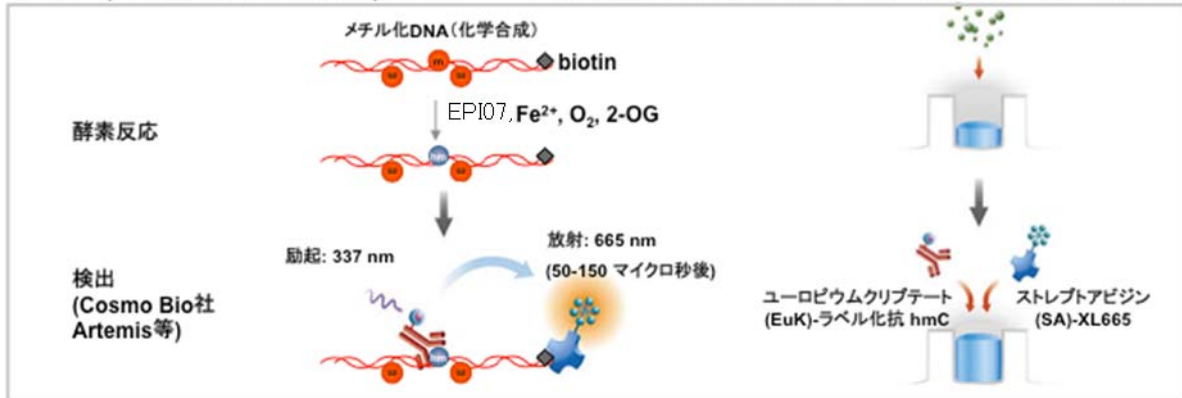


図 26 EPI07 アッセイ系の確立

研究開発項目①で開発した技術を用いての実証研究として各種がん細胞株での H4 テール修飾パターンの解析に着手した。主要な修飾については大きな差が見られなかったが(図 27A)個々の修飾パターンごとに比較を行うと細胞株により修飾組み合わせに相対量に特徴が見られた(図 27B)。今後、細胞種を増やし系統的な解析を行うことで癌腫の識別、新規標的酵素の探索に応用が期待される。

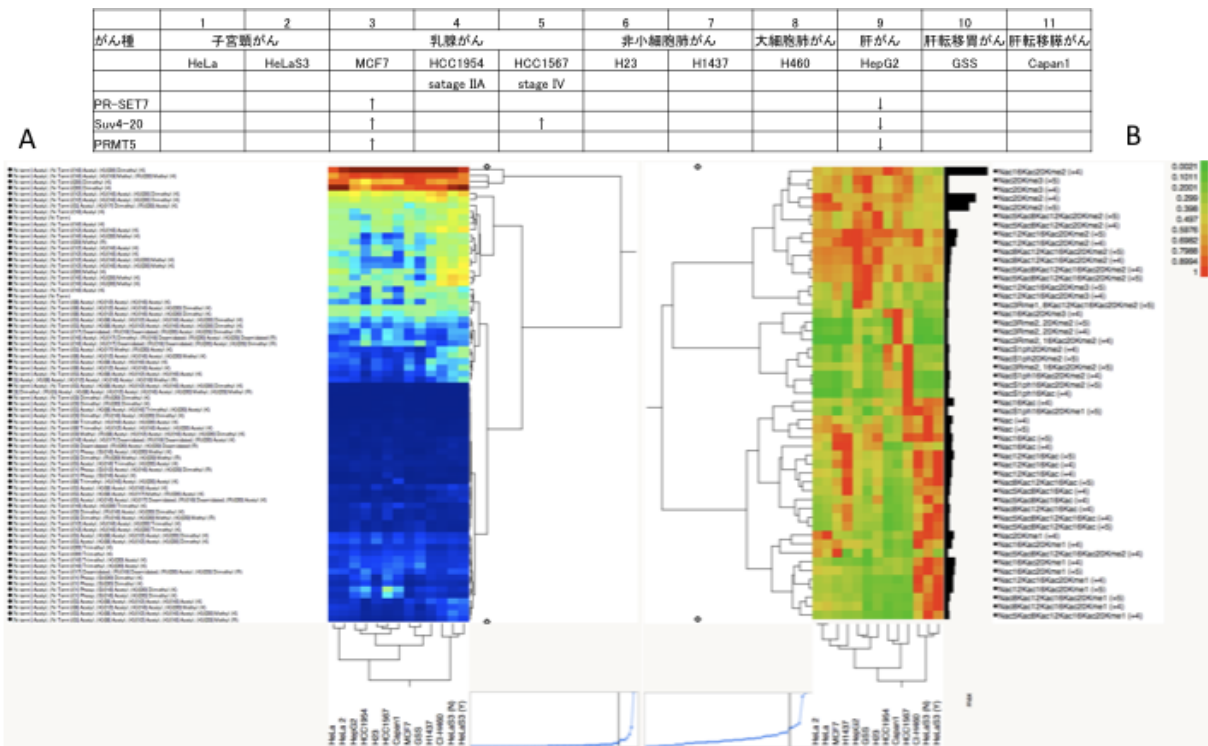


図 27 各種がん細胞より精製したヒストンでの H4 テール修飾プロファイルの解析

2.4. 研究開発項目④「総合調査研究」

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

2015年2月末現在、Illumina社はHiSeq X Tenを発売し、1,000ドルゲノムを達成できると公表した。HiSeq X TenはHiSeq Xという機種を10台セットで販売するシステムで、HiSeqX 1台で2個のフローセルを使用でき、リード長150 bpで3日間で1.6~1.8 テラベース (Tb) の出力が得られる。リード精度は、75%以上の塩基についてエラー率が0.1%以下である。ヒトゲノム配列解析に関して、1人あたり90ギガベース (Gb, 30倍の冗長度) を読む必要があるが、1台 (2フローセル使用)、3日間で16人分の全ゲノム配列が可能である。コストについては、Illuminaの発表によると、試薬代は\$800であり、HiSeq X Tenの機器コスト (HiSeq X Tenを4年間以上利用したときの1ゲノムあたりの減価償却費)は\$135であり、人件費は\$55~\$65となるので、一人のゲノム配列を決めるのに、\$990~\$1,000になるとのことである。なお、HiSeq X Tenの価格は100万ドルで、1台あたり100万ドル (約1.2億円) である。

Life Technologies社は、2012年秋に蛍光試薬を使用せず低コストのシーケンスが可能で、Ion Protonシーケンサーを発売した。この装置は1ランで15~60 Gbの出力が得られ、さらにシーケンシング時間が4~5時間と短いのが特徴である。1日3ランのシーケンシングが可能で、1日当たり約2人分の全ゲノムシーケンシングを行なうことが可能である。当組合でも2013年初めに国内ではいち早く導入し、現在使用中である。

一分子シーケンシング技術は生体内のエピゲノム標識を特定するために期待が大きい。ヘリコス社は早期に開発をはじめていたが、同社の装置は微弱なエバネッセント光を検出する必要があり、20~30塩基の読み取りが限界であり、現在は製造を行っていない。Zero mode waveguide技術でリアルタイムに微弱な蛍光検出を可能にしたPacific Biosciences社のシステムは、数万塩基におよぶ長い配列解読が可能で、しかも修飾されたDNAの検出も可能である。同社のRSシーケンサーは2011年に発売され、現在はRS IIシステムにて発売しており、特にロングリードの用途で用いられている。欠点としては、装置が大きく設置場所の問題があることと配列決定精度が悪い (シングルリードの精度は80~85%) ことがあげられる。

以上のタイプのシーケンサーは、単位時間当たりの配列決定量が大きく、また、蛍光検出を利用しない場合は試薬代が安価になり、光検出器が必要なくなるため、機器も安価になることが期待されている。Oxford Nanopore Technology社は、このようなシーケンサーのカテゴリでナノポアを持つチャンネル分子を利用した装置を世界で初めて実用化し、現在MinION Access programmeに登録した利用者に供給され早期試用が実施されている。同種の機器については、Genia Technologiesや日本のQuantum Biosystemsが開発しているが、前者については直接会社を訪問する機会があり、実際に開発中の装置本体とラボを見学させてもらい、機器の性能等詳細について、また開発状況についても話を聞くことができた。同社の装置本体は30cm立方 (重量数kg) 程度の小型のベンチトップ機器で、USBでPCに接続し運用される。シーケンス性能の詳細はまだ未発表だが、24時間のランで数十Gbの出力が得られ、36時間程度でヒトゲノム解析が完了することとであった。また、シーケンス精度は80%程度でPacific Biosciences社のシステムと同等である。Genia Technologiesは、2014年6月 (同社訪問の直前) にロシュ社に買収され、今後のシーケンサー装置の販売形態等ビジネス面の方針決定は、ロシュ社が行うことになる。

プロテオミクスに用いられる質量分析計 (mass spectrometry : MS) は大きく分けてイオン化法の

違いにより MALDI-TOFMS と LC-MS の 2 種に大別される。MALDI-TOFMS は純度の高い試料を迅速に測定したり、タンパク質の分子量を決定するのに適している。LC-MS は網羅的な同定が必要な探索的研究に用いられるハイブリッド型質量分析計と、高感度定量に適した三連四重極型質量分析計 (triple-quadrupole MS : Triple-Q MS) が用いられる。これらは全て MS/MS と言われる試料をフラグメント化して構造情報 (ペプチドの場合はアミノ酸配列情報) を取得する機能を持つのが一般的である。

MALDI-TOFMS では混合物の測定は困難であるが、ペプチドなら 1 時間で 1,000 測定以上可能であり、高分子タンパク質の測定も簡便にできる。一方、1 測定 (2 時間程度) でタンパク質混合物から 1,000 以上のタンパク質を同定できるのがハイブリッド型 LC-MS であり、Triple-Q MS は血清試料などダイナミックレンジの広い混合物から特定のタンパク質を高感度・幅広い検出濃度 (10 の 5 乗以上) で絶対定量できるのが特徴である。エピゲノム研究においては、ヒストンメチル化酵素や脱メチル化酵素の活性検出には MALDI-TOFMS が用いられており、ヒストン修飾組み合わせの解析にはハイブリッド型質量分析計が使われている。

MALDI-TOFMS は LC-MS に比べ進化の度合いが遅いが、最近の高速 2KHz レーザーの開発もありこの 5 年ほどで主要メーカーはデータ取得速度を上げ、プロジェクト開始時点で用いていた MS の 40 倍のスピードでデータを取得できるようになっている。その他の動作の高速化、高感度化とあわせ、100 倍以上高速である。さらにソフトウェアの改良がみられ SDS-PAGE で染色したタンパク band の同定等も熟練の技術が無くとも出来るようになってきている。本プロジェクトにおいてはスクリーニングのハイスループット化につながり、放射性同位体による高感度酵素活性測定につながる。また、研究に用いるタンパク質の発現チェック等に使用することで実験の信頼性を上げることが出来る。平成 24 年度には、学会出席、開発会社訪問やデモ測定によりこのタイプの機器の詳細な調査を行った。その結果、島津社製・MALDI-7090 がエピゲノム研究開発におけるヒストン修飾の詳細解析に適していると判断し、同年度の加速予算で導入することになった。同機の導入により、ヒストンのアルギニン残基ジメチル化について対称、非対称を区別する解析方法等、最先端の分析法の開発に成功した。

探索的研究に用いられるハイブリッド型 MS は、高速・高感度・高分解能化の競争が激しく、数年前までは 1 秒間に高分解能 MS1 回に、高分解能 MS/MS または 3 低分解能 MS/MS 程度だった物が今では 10 高分解能 MS/MS を出来る物が出ており一測定で 1,000 タンパク以上同定できるのが一般的になりつつある。平成 23 年度に導入した Orbitrap ELITE ETD は高分解能 MS/MS は 1 秒に 4 回程度であるが超高分解能 MS を行うことが出来、他の機種では分離できないトリメチルとアセチル化ペプチド混合物を MS だけで完全に分離識別することが出来る。

ヒストン修飾組み合わせ手法の開発は、米バージニア大学 Donald F Hunt が開発した質量分析計 (MS) での新規ペプチド開裂手法である ETD (electron transfer dissociation : 電子転移解離) を用い、Hunt ラボ出身のプリンストン大学の Benjamin A Garcia、米ウィスコンシン大学の Joshua J. Coon らの少数のグループにより、サーモフィッシャー社の Orbitrap ETD を用いて行われている。ETD は翻訳後修飾解析・塩基性タンパク解析に適した MS/MS のフラグメント化法である。同様な機能に ECD (electron capture dissociation : 電子捕獲解離) があり、これを搭載する機種はサーモフィッシャー社 Orbitrap、ブルカー社、日立など少数あるが、Orbitrap ETD が感度・スピード・分解能の点で優れていると考えられる。

平成 25 年には、従来の Orbitrap のイオン光学系に四重極とイオントラップと四重極を組み合わせ、その上に以上の ETD 機能を持つ Orbitrap Fusion が発売された。同機は、高効率プリカーサーイオン選択が可能で、高分解能の MS 測定をオービトラップ分析計により行うことができる。さらに MS 測定と平行して、後段のイオントラップを用いた高速度の MS/MS 測定を平行して行うことが可能

で、ヒストンメチル化やアセチル化に加え、種々のアシル化のような非常に複雑で詳細な、プロテオミクス解析に適していると考えられた。本装置も開発会社訪問やデモ測定等で詳細に調査した。その結果、期待通りヒストン修飾の詳細解析や従来機種では行うことができなかったヒストン H3 のミドルダウン解析に適していると判断され、平成 25 年度に導入した。

タンパク質定量に関しては、Triple-Q MS を用いた、選択反応モニタリング (selected reaction monitoring : SRM) または多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring : MRM) という手法の開発が急速に進んでいる。当該手法は、低分子化合物の相対、絶対定量に関して 10 年以上前から開発され、現在では薬物動態研究における血液中薬剤定量法の主流となっている。プロテオミクスにも数年前から使われ出し、標的タンパク質の高感度相対、絶対定量に用いられる。世界では数グループがヒト全タンパク質の定量を目指した大規模な研究を行っており、シアトルのシステムバイオロジー研究所 (ISB) ・スイス連邦工科大学では SRM atlas として定量に必要な情報を公開しており (www.srmatlas.org)、これには MS メーカーも参画している。定量に使う全ペプチドセットは、内部標準用に安定同位体ラベルされておらず高額であるが、既に市販もされている。またヒトプロテオーム機構 (HUPO) でもグローバルコンソーシアムにより同様な計画がなされている。国内では九州大と産総研のチームが、全タンパク定量のための標準タンパクを作成してヒトプロテオーム定量システムの構築を行っている。Triple-Q MS はここ数年でのイオンの取り込み・光学系の改良による高感度化が進みアトモレベルの感度が達成されてする。さらに、高速化も図られ、ミリ秒で 1 データの取得が可能であり、1 測定で数百程度のタンパク質の定量が可能になっている。疾患特異的タンパクの定量に関して、健常人から患者までの幅広いダイナミックレンジで定量可能なことが必要である。Triple-Q MS のダイナミックレンジも毎年向上しており、6 桁のダイナミックレンジが達成されている。さらにタンパク質定量に関しては、機器の安定性や測定の堅牢性が重要であり、現在はそのような方向性での技術開発も行われており、今後は ELISA 等の免疫アッセイと並び、タンパク質定量で主流の技術となると考えられる。

本プロジェクトでは、特定のヒストン修飾組み合わせを SRM で定量する系の構築に成功し、絶対定量も試みている。世界的にみてもタンパク質の翻訳後修飾を SRM で定量した報告はほとんど無く、今後注目を浴びる技術と考えられる。

IV. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

1. 実用化に向けての見通し及び取り組みについて

DNA メチル化異常は前がん病変を含む発がんプロセス早期において既に確立されることが多く、がんのスクリーニングのマーカーとして好適である。測定対象は、脱落したがん細胞から血液中に放出された血流中のゲノム DNA であり、早期診断への活用が期待される。多くの癌腫でメチル化異常を示す領域がある一方で、がん種によって選択的にメチル化される遺伝子があることから、一次スクリーニングおよび臓器別のスクリーニングにも有効である可能性が期待される。本プロジェクトでは多数のがん選択的な DNA メチル化マーカーを抽出し、一部は特許出願も終えている。さらに、プロジェクト参画企業により、臨床血液検体を用いた検証、既存のメチル化マーカーとの性能比較も開始した。

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

添付資料

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

健康安心イノベーションプログラム基本計画

健康安心イノベーションプログラム基本計画

平成22年4月1日

産業技術環境局

製造産業局

1. 目的

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

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

2. 政策的位置付け

○新成長戦略（基本方針）（2009年12月30日）

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

○革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略（2009年2月12日改訂）

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

○「ドリームBTジャパン」（2008年12月11日BT戦略推進官民会議）

2002年に策定した「バイオテクノロジー戦略大綱」以降、バイオテクノロジーをめぐる状況が変化してきたことを背景に、新産業の育成・創出、食糧問題解決、バイオマス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

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。

達成する。

- ④高齢者・障害者の自立促進や介護者の負担軽減等のため、優れた技術や創意工夫のある福祉機器の実用化支援を行う。

4. 研究開発内容

I. 創薬・診断

I-1. 革新的医薬品の創出

(1) 糖鎖機能活用技術開発（運営費交付金）

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

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

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

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

①概要

創薬上重要な膜タンパク質は複合体を形成していることも多く、その構造解析及び相互作用の情

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2007年度～2011年度

(4) 新機能抗体創製技術開発 (運営費交付金)

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2006年度～2010年度

(5) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発 (運営費交付金)

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2007年度～2012年度

(6) 幹細胞産業応用促進基盤技術開発 (運営費交付金)

①概要

創薬プロセス効率化や再生医療への応用が期待される i P S 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、i P S 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 i P S 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 i P S 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-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立する。

③研究開発期間

2010年度～2014年度

(2) 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発（運営費交付金）【再掲】

II-2. 再生医療に係る基盤整備

(1) 医療機器開発ガイドライン策定事業

①概要

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

②技術目標及び達成時期

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

③研究開発期間

2008年度～2010年度

III. 医療機器

III-1. 医療機器の開発

(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となり早期のステージのがんに対して、治療方針を決定するために必要ながん性状、並びに位置に関する正確な情報を確実に取得し、得られた診断情報に基づく侵襲性の低い治療を可能とすることで、患者のQOLを向上させる。

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

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。

プロジェクト基本計画

(次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発)
「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」

基本計画

バイオテクノロジー・医療技術部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

①政策的な重要性

本研究開発は、個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として開始した。更に、新たに策定された『日本再興戦略』（平成 25 年 6 月）で示された 3 つのアクションプランの一つ『戦略市場創造プラン』の目標である「国民の健康寿命の延伸」を実現するための施策として位置づけられている。

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

②我が国の状況

近年のギガシーケンサー及び高精度質量分析装置等の解析技術の急速な進展により、後天的ゲノム修飾が疾患等の原因として重要な因子であることが相次いで明らかになり、研究者の注目を集めている。後天的ゲノム修飾は、癌や、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。技術戦略マップ 2009（平成 21 年 4 月経済産業省策定）においても、後天的ゲノム修飾の解析は、波及効果が高く、「画期的な医薬品の開発」、「医薬品開発の効率化」に資する重要技術として位置づけられている。また、2009 年に政府が閣議決定した「新成長戦略」を受け、総合科学技術会議が 2010 年に打ち出した「科学・技術重点施策アクションプラン」において、「ライフイノベーション」の重点的取組項目「がんの早期診断・治療技術の研究開発」の中の施策として、「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発」が取

り上げられている。更に、「医療イノベーション 5 か年戦略」(2012 年 6 月医療イノベーション会議策定)においても、「その他個別化医療実現に向けた研究の推進」として位置づけられている。

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

③世界の取組状況

米国では、NIH（国立衛生研究所）のロードマップの一つに位置づけ、2008 年より 7 年間で総額 2 億ドルを超えるプロジェクトを開始しており、欧州でも第 6 次研究枠組み計画（FP6）に引き続き、2010 年度より第 7 次枠組計画（FP7）の中で後天的ゲノム修飾研究を展開している。我が国においても、既に大学・研究機関を中心に世界に先駆けて後天的ゲノム修飾研究に着手していたが、基礎研究成果を実用化に展開するためには、更に基礎・臨床・産業が一体となって創薬研究基盤を構築する必要がある。

④本事業のねらい

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

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

(2) 研究開発の目標

①過去の取組とその評価

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

- 1) 個別がんでのエピジェネティック異常を解明することに基づいて、がんのリスク、存在、性質の診断技術を開発し、がんを対象としたエピジェネティクス創薬に向けたターゲット探索に取り組む。
- 2) がん以外の後天性疾患（免疫系疾患、神経系疾患、糖尿病等の生活習慣病）へのエピジェネ

ティック異常の関与の有無を解明する。

3) クローン、iPS細胞、ES細胞、再生臓器等における細胞の評価・タイピング・プロファイリングにエピジェネティクスを応用する研究開発を推進する。

4) エピジェネティクス分野での研究を進める上での技術・ツールの開発を促進し、診断目的の高感度・高精度検出装置の開発に取り組む。

②本事業の目標

【最終目標（平成 26 年度末）】

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

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

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

【中間目標（平成 24 年度末）】

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

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

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

③本事業以外に必要とされる取組

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

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

④全体としてのアウトカム目標

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

(3) 研究開発内容

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

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

① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発

③ 探索的実証研究

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

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

なお、各実施者の研究開発能力を最大限に活用し、効率的かつ効果的に研究開発を推進する観点から、NEDO が選定したプロジェクトリーダー東京大学先端科学技術研究センター 教授 油谷浩幸氏の下で、各実施者がそれぞれの研究テーマについて研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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

3. 研究開発の実施期間

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

4. 評価に関する事項

NEDO は、技術的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 24 年度、事後評価を平成 27 年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ、必要に応じ、プロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しするなど、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

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

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

②知的基盤整備事業又は標準化等との連携

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

③知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第 25 条の規定等に基づき、原則として、全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組のあり方や、研究開発成果の産業面での活用のビジネスモデルを念頭に置き研究開発を行うとともに、研究開発の進捗等を考慮し、これらの取組のあり方とビジネスモデルについて、必要な見直しを行う。
- b) 受託者は、上記 a) で立案した取組とビジネスモデルを、本研究開発終了後実行に移し、成果の産業面での活用に努めるものとする。

(2) 基本計画の変更

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

(3) 根拠法

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

(4) 関連指針の厳守

当該プロジェクトの実施にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等、関連指針を厳守する。また、本研究開発成果の事業化においては、「産業経済分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」等を厳守する。

6. 基本計画の改訂履歴

- (1) 平成 22 年 3 月、制定。
- (2) 平成 25 年 2 月、改訂。後天的ゲノム修飾に係る研究を取り巻く現状を踏まえ、1. (1) 研究開発の目的部分に加筆修正。
- (3) 平成 26 年 2 月、健康・医療戦略推進本部が設置され、各省連携により、医療分野の研究開発を政府一体で推進することになったことを踏まえた改訂。

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

1. 研究開発の必要性

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

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

2. 研究開発の具体的内容

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

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

(2) 後天的ゲノム修飾解析技術の情報解析基盤技術の開発

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

3. 達成目標

【最終目標（平成 26 年度末）】

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

【中間目標（平成 24 年度末）】

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

研究開発項目②「後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発」

1. 研究開発の必要性

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

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

2. 研究開発の具体的内容

(1) 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術の開発

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

3. 達成目標

【最終目標（平成 26 年度末）】

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

【中間目標（平成 24 年度末）】

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

研究開発項目③「探索的実証研究」

1. 研究開発の必要性

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

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

2. 研究開発の具体的内容

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

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

(2) 探索的実証研究

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

3. 達成目標

【最終目標 (平成 26 年度末)】

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

【中間目標 (平成 24 年度末)】

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

以上

事前評価関連資料

- ・ 事前評価書
- ・ パブリックコメント募集の結果について

事前評価書

	作成日	平成 22 年 3 月 2 日
1. 事業名称	革新的な医療機器・創薬等の開発 後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した創薬基盤技術開発	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1)概要：医薬品開発や診断を効率的に行うため、疾患原因となるゲノムの後天的修飾（後天的な遺伝子変化）を解析する技術や疾患との関連づけを行う手法の開発等を行うことを目的に、以下の研究開発を実施する。</p> <p>①後天的ゲノム修飾解析技術開発 ②後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける基盤技術開発 ③探索的実証研究</p> <p>(2)事業規模：平成 22 年度 3.2 億円（予定） (3)事業期間：平成 22 年度～26 年度（5 年間）</p>	
4. 評価の検討状況		
<p>(1)事業の位置付け・必要性</p> <p>①事業の位置付け 個別化医療・予防医療・再生医療の実現や画期的な新薬の開発、医療機器、福祉機器等の開発・実用化を促進することによって健康寿命を延伸し、今後、世界に類を見ない少子高齢化社会を迎える我が国において、国民が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指すことを目的とする「健康安心イノベーションプログラム」の一環として実施する。</p> <p>②必要性 現在の医薬品開発においては、副作用が少なく効果的な薬の開発のため、ゲノム情報を活用した創薬研究が主流となってきた。創薬における研究開発費が 1 物質当たり 500 億円を超え増加の一途をたどる一方で、新薬上市件数は低下するという世界的傾向の中、創薬研究の効率を上げ、研究開発リスクを低減させることが喫緊の課題となっている。医薬産業政策研究所「製薬産業の将来像」によれば、創薬プロセスにおけるボトルネックの一つとして、標的分子候補と疾病の関係を推定し新薬の目標を確定する「ターゲットバリデーション」が挙げられており、画期的な新薬を生み出すためには、基礎研究の進展に伴う新しい知見を取り込み、新規メカニズムに基づく創薬標的分子を同定していくことが重要である。</p>		
<p>(2)研究開発目標の妥当性 近年のギガシーケンサー及び高精度質量分析装置等の解析技術の急速な進展により、後天的ゲノム修飾が疾患等の原因として重要な因子であることが相次いで明らかになり、世界中の研究者の注目を集めている。後天的ゲノム修飾は、がんや、アルツハイマー病等の精神疾患、生活習慣等の後天的疾患の原因として重要な因子であるとともに、ヒトの病気、老化、発生、分化、成長に大きな役割を果たしていることが判明し始めており、その解析と制御が、新しい創薬標的の創出や新しい作用機序を持つ治療薬等の開発に資すると期待されている。 本事業では、疾患の原因となる後天的ゲノム修飾の効果的・効率的解析手法の開発を行い、後天的ゲノム修飾を高感度で検出するシステムを構築するとともに、複数種類のがんと関連づけを行うための基盤技術を世界に先駆けて開発する。さらに、後天的ゲノム修飾に起因する複数種類のがんに対し、後天的ゲノム修飾を制御する分子等を用いた探索的実証研究を通じて、基盤技術としての有用性を検証する。</p>		
<p>(3)研究開発マネジメント 公募により最適な研究開発体制を構築する。研究体には、NEDO が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究開発項目毎にサブ・プロジェクトリーダーを置くとともに、研究者を結集し、集中研究方式にて効率的な研究開発を実施する。 外部有識者から構成される研究開発推進委員会（仮称）を設け、委員会を年 2 回開催するとともに、必要に応じて開発テーマ毎の分科会を適宜開催し、研究開発の進捗管理を行うとともに、進捗状況を</p>		

踏まえた予算配分や事業計画の策定を行う。
<p>(4)研究開発成果</p> <p>後天的ゲノム修飾を現状の 100 倍程度の高感度高精度で解析する技術、および解析データの標準的情報処理技術を確立する。</p> <p>これらの解析技術も活用し、ヒト臨床サンプルを対象として、後天的ゲノム修飾と疾患を関連づける創薬・診断標的候補分子を選定する。</p> <p>候補分子を制御する因子を用いて創薬・診断標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。</p>
<p>(5)実用化・事業化の見通し</p> <p>プロジェクト期間中に最先端の技術を、学から民へと移転をするとともに、創薬ターゲットとなりうる後天的ゲノム修飾が解析されれば、企業による医薬品開発が加速され、20 数年後には、1 製品あたり 1000 億を超えるブロックバスターと呼ばれる医薬品の導出も期待される。さらに将来、個人の後天的ゲノム情報に基づいて疾患の個体差や進行度に応じた標的治療薬による質と費用対効果の高い治療が実現されれば、国民の健康の維持・増進や創薬産業等のイノベーション、医療財政の負担軽減、我が国の国際競争力の強化に大きく寄与することが期待できる。</p>
<p>(6)その他特記事項</p> <p>特になし。</p>
<p>5. 総合評価</p> <p>創薬プロセスにおけるボトルネックとされている疾患標的分子の同定に資すると期待される、疾患等の原因として重要な因子である「後天的ゲノム修飾」の解析に必要な基盤技術開発を行うものである。各種の医薬品産業の将来調査や米国等海外での大規模プロジェクト実施の動きに合致するとともに、産業界からの要望も高く、かつ、広く産業全体に寄与する基盤技術であることから、ナショナルプロジェクトとして実施する意義は高い。また、これまでの NEDO プロジェクト成果の活用によって、本事業の効率的かつ円滑な推進が見込まれる。</p> <p>以上のことから、NEDO が実施する事業として適切であると判断する。</p>

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

平成 22 年 3 月 24 日

N E D O

バイオテクノロジー・医療技術開発部

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

お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間

平成 22 年 3 月 5 日～平成 22 年 3 月 18 日

2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞

計 1 件

3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

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

以上

文献発表・学会発表等・特許出願

<文献発表・学会発表等>

発表年月日	発表媒体	発表タイトル	発表者
(文献発表)			
2010年11月	Proc Natl Acad Sci U S A. 107(46):19891-6. 2010	Testis-specific protein on Y chromosome (TSPY) represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ-cell tumors.	Akimoto C, Ueda T, Inoue K, Yamaoka I, Sakari M, Obara W, Fujioka T, Nagahara A, Nonomura N, Tsutsumi S, Aburatani H, Miki T, Matsumoto T, Kitagawa H, Kato S.
2010年11月	Am J Pathol. 177(5):2191-204. 2010	Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas.	Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
2010年11月	改訂第5版 実験医学別冊 新遺伝子工学ハンドブック	メチル化 DNA の解析～DNAメチル化解析のパイプラインと MeDIP-Seq 法	永江玄太、油谷浩幸
2010年12月	Gan To Kagaku Ryoho. 2011 Jan;38(1):1-6.	Cancer genome analysis through next-generation sequencing.	Aburatani H.
2010年12月	Mol Cell Biol. 30(24):5636-48. 2010	Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism.	Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T.
2010年12月	BMC Molecular Biology (2010) 11:99 DOI: 10.1186/147-2199-11-99	A thymus-specific noncoding RNA, Thy-ncR1, is a cytoplasmic riboregulator of MFAP4 mRNA in immature T-cell lines	Aoki K, Harashima A, Sano M, Yokoi T, Nakamura S, Kibata M, Hirose T.
2010年12月	Neurochem. 115(6):1633-42. 2010	Identification of CD44 as a cell surface marker for Müller glia precursor cells.	Shinoe T, Kuribayashi H, Saya H, Seiki M, Aburatani H, Watanabe S.
2010年12月	J Comp Neurol. 518(23):4702-22. 2010	Establishment of mice expressing EGFP in the placode-derived inner ear sensory cell lineage and FACS-array analysis focused on the regional specificity of the otocyst.	Fujimoto C, Ozeki H, Uchijima Y, Suzukawa K, Mitani A, Fukuhara S, Nishiyama K, Kurihara Y, Kondo K, Aburatani H, Kaga K, Yamasoba T, Kurihara H.
2010年12月	Oncogene. 2010 Dec 6. [Epub ahead of print], 2011 Apr 7;30(14):1693-705. doi: 10.1038/onc.2010.546.	Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells.	Ehata S, Johansson E, Katayama R, Koike S, Watanabe A, Hoshino Y, Katsuno Y, Komuro A, Koinuma D, Kano MR, Yashiro M, Hirakawa K, Aburatani H, Fujita N, Miyazono K.
2010年12月	医学のあゆみ 235, 995-1000 (2010)	エピゲノム制御にかかわるヒストン修飾のイメージング	木村 宏、林 陽子
2010年12月	医学のあゆみ 235, 1008-1012 (2010)	哺乳類細胞におけるヒストン脱メチル化機構	立石敬介
2010年12月	医学のあゆみ 235, 1013-1018 (2010)	明らかになってきたエピゲノム制御における RNA の役割	廣瀬哲郎

2011 年 1 月	Encyclopedia of Life Sciences DOI: 10.1002/9780470015902.a0005019.pub2	Gas5 gene	Tetsuro Hirose
2011 年 1 月	EMBO Journal 30, 328-340 (2011)	Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore.	Bergmann JH, Rodríguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE, Earnshaw WC
2011 年 1 月	J Biol Chem. 286(1):674-86. 2011	Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors.	Daigo K, Kawamura T, Ohta Y, Ohashi R, Katayose S, Tanaka T, Aburatani H, Naito M, Kodama T, Ihara S, Hamakubo T.
2011 年 2 月	Genome Research	Broad chromosomal domains of histone modification patterns in <i>C. elegans</i> .	Liu T, Rechtsteiner A, Egelhofer TA, Vielle A, Latorre I, Cheung MS, Ercan S, Ikegami K, Jensen M, Kolasinska-Zwierz P, Rosenbaum H, Shin H, Taing S, Takasaki T, Iniguez AL, Desai A, Dernburg AF, Kimura H, Lieb JD, Ahringer J, Strome S, Liu XS
2011 年 2 月	Oncogene. 30(5):619-30. 2011	Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells.	Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, Gojyobori T, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S.
2011 年 2 月	Mol Cell Neurosci. 2011 Feb 24. [Epub ahead of print]	β -Catenin signaling regulates the timing of cell differentiation in mouse retinal progenitor cells.	Ouchi Y, Baba Y, Koso H, Taketo MM, Iwamoto T, Aburatani H, Watanabe S.
2011 年 3 月	J Biol Chem. 2011 Mar 14. [Epub ahead of print], 2011 Apr 29;286(17):14963-71. doi: 10.1074/jbc.M111.218867	Marked induction of c-Maf during Th17 differentiation and its implication in memory Th cell development.	Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Yoh K, Takahashi S, Aburatani H, Mimura T.
2011 年 3 月	Tumour Biol. 2011 Mar 1. [Epub ahead of print], 2011 Jun;32(3):611-22. doi: 10.1007/s13277-011-0160-y.	Stable knockdown of S100A4 suppresses cell migration and metastasis of osteosarcoma.	Fujiwara M, Kashima TG, Kunita A, Kii I, Komura D, Grigoriadis AE, Kudo A, Aburatani H, Fukayama M.
2011 年 3 月	Proc Natl Acad Sci U S A., 2011, 108:5718-5723.	Lysine methyltransferase G9a is required for de novo DNA methylation and establishment but not maintenance of proviral silencing.	Leung, D. Dong, K. Maksakova, I. Goyal, P. Appanah, R. Lee, S. Tachibana, M. Shinkai, Y. Lehnertz, B. Mager, D. Rossi, F. and Lorincz, M.C.
2011 年 3 月	J. Cell Biol. 193, 31-39 (2011)	Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice.	Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, Hirose, T.

2011 年 4 月	Hum Mol Genet. 2011 Jul 15;20(14):2710-21. [Epub 2011 Apr 19.]	Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation.	Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshiba S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H
2011 年 5 月	Nat Genet. 2011;43(5):464-9.	High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome.	Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T.
2011 年 5 月	Nucleic Acids Res. 39, 6475-6488, 2011.	Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling.	Hayashi-Takanaka Y, Yamagata K, Wakayama T, Stasevich TJ, Kainuma T, Tsurimoto T, Tachibana M, Shinkai Y, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H.
2011 年 5 月	Hum Mol Genet. 2011 Aug 15;20(16):3188-97. [Epub 2011 May 18.]	Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes.	Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D.
2011 年 6 月	EMBO J. 2011;30(13):2582-95.	Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression.	Kanki Y, Kohro T, Jiang S, Tsutsumi S, Mimura I, Suehiro JI, Wada Y, Ohta Y, Ihara S, Iwanari H, Naito M, Hamakubo T, Aburatani H, Kodama T, Minami T.
2011 年 6 月	J Biol Chem. 2011;286(34):29848-60. [Epub 2011 Jun 6]	Cell-type specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 and hepatocyte nuclear factor 4 α in HepG2 cells.	Mizutani A, Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Morikawa M, Suzuki HI, Imamura T, Miyazono K, Aburatani H.
2011 年 6 月	Cell Stem Cell. 2011, 8:676-687.	DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements and chimaeric transcripts in mouse ES cells.	Karimi, M.M. Goyal, P. Maksakova, I.A. Bilenky, M. Leung, D. Tang, J.X. Shinkai, Y. Mager, D.L. Jones, S. Hirst M. and Lorincz, M.C.
2011 年 6 月	実験医学 29, 1736-1742 (2011)	核内構造体形成を司る長鎖 ncRNA	長沼孝雄、廣瀬哲郎
2011 年 7 月	Nucleic Acids Res. 2011;39(20):8712-27. [Epub 2011 Jul 15.]	ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif.	Morikawa M, Koinuma D, Tsutsumi S, Vasilaki E, Kanki Y, Heldin CH, Aburatani H, Miyazono K.
2011 年 7 月	Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(30):12384-9.	Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells.	Watanabe A, Ogiwara H, Ehata S, Mukasa A, Ishikawa S, Maeda D, Ueki K, Ino Y, Todo T, Yamada Y, Fukayama M, Saito N,

			Miyazono K, Aburatani H.
2011 年 7 月	Lung Cancer. 75(1):119-25. 2012 [Epub 2011 Jul 6.]	ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis.	Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, Ninomiya H, Inamura K, Ishikawa S, Ushijima M, Matsuura M, Jones MH, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani H.
2011 年 7 月	J Bone Miner Res. 2011 Jul 6. doi: 10.1002/jbmr.464. [Epub ahead of print]	Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: Possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1.	Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S.
2011 年 7 月	Cancer Res. 2011;71(13):4628-4639.	Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21.	Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H.
2011 年 7 月	医学のあゆみ 238, 400-406 (2011)	非コード RNA の新しい制御機能と疾患への関わり	廣瀬哲郎
2011 年 9 月	J Clin Bioinforma. 2011 Sep 3;1(1):23.PMID: 21888658	Preferential expression of potential markers for cancer stem cells in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. An FFPE proteomic study.	Nomura M, Fukuda T, Fujii K, Kawamura T, Tojo H, Kihara M, Bando Y, Gazdar AF, Tsuboi M, Oshiro H, Nagao T, Ohira T, Ikeda N, Gotoh N, Kato H, Marko-Varga G, Nishimura T.
2011 年 9 月	N Am J Med Sci. 3(9): 394-9. 2011.	Involvement of proteasome β 1i subunit, LMP2, on development of uterin leiomyosarcoma.	Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells frHayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Nagase S, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Tonegawa S, Konishi I.
2011 年 9 月	臨床検査 55, 900-905 (2011)	長鎖非コード RNA の性状と疾患への関与	廣瀬哲郎
2011 年 10 月	PLoS Genetics 2011;7(10):e1002311.	Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation.	Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, Hirose-Yotsuya L, Take K, Sun W, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Fujita T, Aoyama T, Tsutsumi S, Ueki K, Kodama T, Sakai J, Aburatani H, Kadowaki T.

2011年10月	PLoS One. 2011;6(10):e26052. [Epub 2011 Oct 7.]	DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers.	Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H.
2011年10月	Cancer Res. 2011 Dec 1;71(23):7187-97. [Epub 2011 Oct 11.]	Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes.	Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M.
2011年11月	Nature Commun., 2011, 2:533.	MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a.	Chang, Y. Sun, L. Kokura, K. Horton, J.R. Fukuda, M. Espejo, A. Izumi, V. Koomen, J.M. Bedford, M.T. Zhang, X. Shinkai, Y. Fang, J. and Cheng, X.
2011年11月	PLoS Genet. 2011 Nov;7(11):e1002359. [Epub 2011 Nov 3.]	Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence.	Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, Aburatani H.
2011年12月	Genome Res. 2012 ;22(2):208-19	Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency.	Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H.
2011年12月	Sci Rep. 1:180. 2011.	Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy.	Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Tagawa Y, Nishimura R, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Konishi I.
2012年1月	Br J Cancer. 2012;106(1):126-32.	Potential responders to FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis.	Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, Yagi K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama Y, Aburatani H.
2012年1月	Mol Cell. 2012, 45:123-131.	DNA damage signalling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/CCdh1 in senescent cells.	Takahashi, A. Imai, Y. Yamakoshi, K. Kuninaka, S. Ohtani, N. Yoshimoto, S. Hori, S. Tachibana, M. Anderton, E. Takeuchi, T. Shinkai, Y. Peters, G. Saya, H. and Hara, E.
2012年1月	Frontier in Bioscience 17: 1729-1746 (2012)	Architectural roles of long noncoding RNAs in the intranuclear formation of functional paraspeckles.	Kawaguchi, T., Hirose, T.,
2012年1月	Mol Cell Proteomics. 2012 Jan 25. [Epub ahead of print] PMID: 22278372	The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of	Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, Sudou Y, Kodama T, Naito M, Inoue K, Hamakubo T.

		neutrophil extracellular traps. Daigo K	
2012 年 2 月	Cancer Sci. 2012; 103(4):670-6. [Epub 2012 FEB 27]	Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation.	Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K.
2012 年 2 月	Pharmacogenomics. 2012; 13(2):191-9.	Genomic approach towards personalized anticancer drug therapy.	Midorikawa Y, Tsuji S, Takayama T, Aburatani H.
2012 年 2 月	Am J Pathology 2012;180(2):616-25.	Intermediate methylation epigenotype and its correlation to KRAS mutation in conventional colorectal adenoma.	Yagi K, Takahashi H, Akagi K, Matsusaka K, Seto Y, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A.
2012 年 2 月	Cell Stem Cell 10, 157-170, 2012.	Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ES cells.	Brookes E, de Santiago I, Hebenstreit D, Morris KJ, Carroll T, Xie SQ, Stock JK, Heidemann M, Eick D, Nozaki N, <u>Kimura H</u> , Ragoussis J, Teichmann SA, and Pombo A.
2012 年 2 月	Cancer Sci. 103(4):670-6. 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PMID:22320381	Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation	Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K.
2012 年 4 月	RNA 2012; 18(4): 738-51.	Identification of cis- and trans-acting factors involved in the localization of MALAT-1 noncoding RNA to nuclear speckles.	Miyagawa R, Tano K, Mizuno R, Nakamura Y, Ijiri K, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Mayeda A, Hirose T, Akimitsu N.
2012 年 4 月	Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(15): 5693-8.	U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells.	Ideue T, Adachi S, Naganuma T, Tanigawa A, Natsume T, Hirose T.
2012 年 4 月	Cancer Sci. 2012 Apr;103(4):670-6.	Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation.	Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K.
2012 年 5 月	PLoS One. 7(5):e37431. 2012.	Genotype-Dependent Efficacy of a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR Inhibitor, RAD001, in Endometrial Carcinomas.	Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y.
2012 年 5 月	Mol Cell Biol. 32(15): 3018-32. 2012.	Dynamic change of the chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of HIF1 and	Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro JI, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K,

		KDM3A.	Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y.
2012 年 6 月	Nat Commun. 3:883. 2012.	Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell.	Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O.
2012 年 6 月	Int J Gynecol Cancer. 22(5):725-31. 2012.	Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer.	Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraie O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y.
2012 年 6 月	Blood. 2012 Jun 28;119(26):6234-42.	Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples.	Kumano K, Arai S, Hosoi M, Taoka K, Takayama N, Otsu M, Nagae G, Ueda K, Nakazaki K, Kamikubo Y, Eto K, Aburatani H, Nakauchi H, Kurokawa M.
2012 年 7 月	Cancer Cell. 22(1):66-79. 2012.	Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming.	Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H.
2012 年 7 月	Cancer Res. 72(14):3445-50. 2012.	Epstein-barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis.	Kaneda A, Matsusaka K, Aburatani H, Fukayama M.
2012 年 8 月	J Histochem Cytochem. 60(11):822-31. 2012.	Increased Expression and Aberrant Localization of Mucin 13 in Metastatic Colon Cancer.	Gupta BK, Maher DM, Ebeling MC, Sundram V, Koch MD, Lynch DW, Bohlmeier T, Watanabe A, Aburatani H, Puumala SE, Jaggi M, Chauhan SC.
2012 年 8 月	RNA 2012 18(8):1487-99.	Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice.	Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T, Prasanth KV.
2012 年 9 月	J Neurosci. 32(36):12543-12557. 2012.	Sox21 Promotes Hippocampal Adult Neurogenesis via the Transcriptional Repression of the Hes5 Gene.	Matsuda S, Kuwako KI, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H, Okano H.
2012 年 9 月	BMC Syst Biol. 6(1): 124. 2012.	A simple knowledge-based mining method for exploring hidden key molecules in a human biomolecular network.	Tsuji S, Ihara S, Aburatani H.
2012 年 9 月	Oncogene. 2012 Sep 10. doi: 10.1038/onc.2012.399. [Epub ahead of print]	The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells.	Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R,

			Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T.
2012年9月	Cell Mol Life Sci. 2012; 69(18):3027-36.	Paraspeckle nuclear bodies--useful uselessness?	Nakagawa S, Hirose T.
2012年10月	Development. 139(20): 3806-16. 2012.	Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development.	Tan SL, Nishi M, Ohtsuka T, Matsui T, Takemoto K, Kamio-Miura A, Aburatani H, Shinkai Y, Kageyama R.
2012年10月	EMBO Journal 2012; 31(20) 4020-34	Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles.	Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T.
2012年10月	Biomolecular Concepts	Paraspeckles: possible nuclear hubs by the RNA for the RNA	Hirose T, Nakagawa S.
2012年10月	Virchows Arch. 2012; 461(4): 367-77.	ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability.	Abe H, Maeda D, Hino R, Otake Y, Isogai M, Ushiku AS, Matsusaka K, Kunita A, Ushiku T, Uozaki H, Tateishi Y, Hishima T, Iwasaki Y, Ishikawa S, Fukayama M.
2012年11月	EMBO J. 31(23):4404-14. 2012.	TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed.	Papantonis A, Kohro T, Baboo S, Larkin JD, Deng B, Short P, Tsutsumi S, Taylor S, Kanki Y, Kobayashi M, Li G, Poh HM, Ruan X, Aburatani H, Ruan Y, Kodama T, Wada Y, Cook PR.
2012年11月	Int J Hematol. 96(5):638-48. 2012.	Upregulation of CD200R1 in lineage-negative leukemic cells is characteristic of AML1-ETO-positive leukemia in mice.	Kagiyama Y, Kitaura J, Togami K, Uchida T, Inoue D, Matsukawa T, Izawa K, Kawabata KC, Komeno Y, Oki T, Nakahara F, Sato K, Aburatani H, Kitamura T.
2012年11月	Cancer Sci. 2012 Nov 19. doi: 10.1111/cas.12065. [Epub ahead of print]	Lung cancer with loss of BRG1/BRM, shows epithelial mesenchymal transition phenotype and distinct histologic and genetic features.	Matsubara D, Kishaba Y, Ishikawa S, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Hoshino H, Sugiyama Y, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M, Niki T.
2012年12月	Proc Natl Acad Sci U S A. 109(50): 20584-9. 2012.	CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5.	Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H, Tsutsumi S, Mutoh H, Maeda S, Yamagata Y, Seto Y, Aburatani H, Hatakeyama M.
2013年2月	Development. 2013 Feb; 140(4): 740-50.	The early retinal progenitor-expressed gene Sox11 regulates the timing of the differentiation of retinal cells.	Usui A, Mochizuki Y, Iida A, Miyauchi E, Satoh S, Sock E, Nakauchi H, Aburatani H, Murakami A, Wegner M, Watanabe S.

2013 年 2 月	PLoS One. 2013;8(2):e56399. doi: 10.1371/journal.pone.0056399. Epub 2013 Feb 20.	The Role of NF- κ B Signaling in the Maintenance of Pluripotency of Human Induced Pluripotent Stem Cells.	Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K.
2013 年 3 月	Virus Res. 2013 Mar 21. [Epub ahead of print]	Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells.	Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, Ishikawa S, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M.
2013 年 3 月	Cancer Res. 2013 Mar 14. [Epub ahead of print]	Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages.	Osawa T, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro JI, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, Shibuya M.
2013 年 3 月	RNA biology 2013 Mar 10. 16;10(3). 456-61.	Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs.	Naganuma T, Hirose T.
2013 年 4 月	Cancer Res. 2013;73(7):2221-34	Erlotinib prolongs survival in pancreatic cancer by blocking gemcitabine-induced MAPK signals.	Miyabayashi K, Ijichi H, Mohri D, Tada M, Yamamoto K, Asaoka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Omata M, Moses HL, Koike K.
2013 年 5 月	Nat Commun. 4:1853. 2013. May.	Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci.	Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y.
2013 年 5 月	Sci Rep. 3:1911. 2013. Published online 2013 May 29.	PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer.	Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H.
2013 年 5 月	Carcinogenesis. 2013 Oct;34(10):2380-8. doi: 10.1093/carcin/bgt174. Epub 2013 May 22.	Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells.	Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K.
2013 年 6 月	Am J Pathol. 182(6):2191-203. 2013 June.	Sperm-Associated Antigen 4, a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1 Target, Regulates Cytokinesis, and Its Expression Correlates with the Prognosis of Renal Cell Carcinoma.	Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M.
2013 年 6 月	Oncogene. 2013 Jun 10. doi: 10.1038/onc.2013.204. [Epub ahead of print]	EVII oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis.	Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K,

			Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M.
2013 年 6 月	EMBO J. 32(12):1665-80. 2013. Jun.	Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer.	Takayama KI, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, Urano T, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Aburatani H, Hayashizaki Y, Inoue S.
2013 年 7 月	Mol Brain. Jul 8;6:31.	The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis.	Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H.
2013 年 8 月	Nat Genet. 2013 Aug;45(8):860-7. doi: 10.1038/ng.2699. Epub 2013 Jun 24.	Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma.	Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S.
2013 年 10 月	Nat Genet. 2013 Oct;45(10):1232-7. doi: 10.1038/ng.2731. Epub 2013 Aug 18.	Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms.	Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koefler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S.
2013 年 10 月	Nature (2013) Oct 10; 502(7470):249-253	Uhrf1-dependent ubiquitylation of histone H3 at lysine 23 couples maintenance DNA methylation and DNA replication	Atsuya Nishiyama, Luna Yamaguchi, Jafar Sharif, Yoshikazu Johmura, Takeshi Kawamura, Keiko Nakanishi, Shintaro Shimamura, Tatsuhiko Kodama, Fuyuki Ishikawa, Haruhiko Koseki and Makoto Nakanishi

2013年10月	Carcinogenesis 2013;34(10):2380-8	KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells.	Yamamoto S, <u>Tateishi K</u> , Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K.
2013年11月	J Bone Miner Res. 28(11):2392-9. 2013. Nov.	Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function.	Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K.
2013年11月	Genes Cells. 18(11):921-33. 2013. Nov.	GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation.	Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M.
2013年11月	J Clin Invest. 123(11):4627-40. 2013. Nov.	Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations.	Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T.
2013年11月	J Exp Med. 2013 Nov 18;210(12):2627-39. doi: 10.1084/jem.20131144. Epub 2013 Nov 11.	Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders.	Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A.
2013年11月	Neuro Oncol. 2014 Jan;16(1):140-6. doi: 10.1093/neuonc/not144. Epub 2013 Nov 26.	H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients.	Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N.
2013年11月	J Biol Chem. 2013 Dec 27; 288(52): 36948-56. Epub 2013 Nov 8.	Control of histone H3 lysine 9 (H3K9) methylation state via cooperative two-step demethylation by Jumonji domain containing 1A (JMJD1A) homodimer.	Goda S, Isagawa T, Chikaoka Y, Kawamura T, Aburatani H.
2013年12月	Front Genet. 4:271. 2013. Dec.	Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation.	Kikuchi Y, Tsuji E, Yagi K, Matsusaka K, Tsuji S, Kurebayashi J, Ogawa T, Aburatani H, Kaneda A.

2014 年 1 月	FASEB J. 2014 Apr;28(4):1870-9. doi: 10.1096/fj.13-245522. [Epub 2014 Jan 3.2014]	Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart.	6) Matsuoka K, Asano Y, Higo S, Tsukamoto O, Yan Y, Yamazaki S, Matsuzaki T, Kioka H, Kato H, Uno Y, Asakura M, Asanuma H, Minamino T, Aburatani H, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S.
2014 年 1 月	Nucleic Acids Res. 2014 Jan 23. [Epub ahead of print]	MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters.	Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama
2014 年 1 月	Nucleic Acids Research (AOP) doi:10.1093/nar/gkt1373	Bisulfighter: accurate detection of methylated cytosines and differentially methylated regions	Yutaka Saito, Junko Tsuji and Toutai Mituyama
2014 年 1 月	Mol Biol Cell Jan;25(1):169-83.	NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies.	Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G.
2014 年 1 月	Neuro Oncol. 16(1):140-6. 2014. Jan.	H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients.	Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N.
2014 年 1 月	Science. 343(6167):189-93. 2014. Jan.	Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma.	Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF.
2014 年 1 月	Biochem Biophys Res Commun 2014 Jan 17;443(3):980-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.078. Epub 2013 Dec 19.	miR-142-3p enhances FcεRI-mediated degranulation in mast cells.	Yamada Y, Kosaka K, Miyazawa T, Kurata-Miura K, Yoshida T
2014 年 1 月	Mol. Biol. Cell 25, 169-183 (2014) .	NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies.	Hirose T*, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox A*, Pierron G*. (*co-corresponding).
2014 年 2 月	Leukemia. 28(2):241-7. 2014. Feb.	Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes.	Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T,

			Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S.
2014年2月	Sci Rep. 4:4012. 2014. Feb.	A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K(-), identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition.	Okii T, Nishimura K, Kitaura J, Togami K, Maehara A, Izawa K, Sakaue-Sawano A, Niida A, Miyano S, Aburatani H, Kiyonari H, Miyawaki A, Kitamura T.
2014年2月	Int J Cancer. 2014 Feb 6. doi: 10.1002/ijc.28768. [Epub ahead of print].	Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome.	Arai E, Sakamoto H, Ichikawa H, Totsuka H, Chiku S, Gotoh M, Mori T, Nakatani T, Ohnami S, Nakagawa T, Fujimoto H, Wang L, Aburatani H, Yoshida T, Kanai Y.
2014年2月	Cell Stem Cell. 2014 Feb 6;14(2):217-27.	Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells.	Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S.
2014年2月	Biochem Biophys Res Commun. 2014 Feb 28;445(1):132-7	Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor.	Ueda K, Fujiki K, Shirahige K, Gomez-Sanchez CE, Fujita T, Nangaku M, Nagase M.
2014年3月	Int J Cancer. 2014 Mar 3. doi: 10.1002/ijc.28814. [Epub ahead of print]	Methylation epigenotypes and genetic features in colorectal laterally spreading tumors.	Sakai E, Ohata K, Chiba H, Matsushashi N, Doi N, Fukushima J, Endo H, Takahashi H, Tsuji S, Yagi K, Matsusaka K, Aburatani H, Nakajima A, Kaneda A.
2014年3月	PLoS One. 2014 Mar 10;9(3):e91330. doi: 10.1371/journal.pone.0091330. eCollection 2014	Concurrent Activation of Acetylation and Tri-Methylation of H3K27 in a Subset of Hepatocellular Carcinoma with Aggressive Behavior.	Hayashi A, Yamauchi N, Shibahara J, Kimura H, Morikawa T, Ishikawa S, Nagae G, Nishi A, Sakamoto Y, Kokudo N, Aburatani H, Fukayama M.
2014年3月	PLoS One. 2014 Mar 21;9(3):e92689.	Genome-Wide Analysis of the Chromatin Composition of Histone H2A and H3 Variants in Mouse Embryonic Stem Cells.	Yukawa M, Akiyama T, Franke V, Mise N, Isagawa T, Suzuki Y, Suzuki MG, Vlahovicek K, Abe K, Aburatani H, Aoki F.
2014年3月	Chem Med Chem. 2014 Mar;9(3):657-64.	Design, synthesis, and biological activity of NCC149 derivatives as histone deacetylase 8-selective inhibitors.	Suzuki T, Muto N, Bando M, Itoh Y, Masaki A, Ri M, Ota Y, Nakagawa H, Iida S, Shirahige K, Miyata N.
2014年4月	Genome Biol. 15(4):R63. 2014	Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two	Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro JI, Sugiyama A,

		response elements.	Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y.
2014 年 4 月	Int J Cancer. 135(11):2493-506. 2014	ROBO1, a tumor suppressor and critical molecular barrier for localized tumor cells to acquire invasive phenotype: Study in African-American and Caucasian prostate cancer models.	Parray A, Siddique HR, Kuriger JK, Mishra SK, Rhim JS, Nelson HH, Aburatani H, Konety BR, Koochekpour S, Saleem M.
2014 年 4 月	Cell Metabolism. 19(5):780-94, 2014	Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells.	Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S.
2014 年 4 月	Nucleic Acids Res. 42(6):e45. 2014.	Bisulfighter: accurate detection of methylated cytosines and differentially methylated regions.	Saito Y, Tsuji J, Mituyama T.
2014 年 4 月	Virchows Arch. 2014 Apr;464(4):463-71. doi: 10.1007/s00428-014-1541-6. Epub 2014 Jan 21. PubMed PMID: 24446035	Clinicopathological and prognostic significance of EZH2 expression in upper urinary tract carcinoma.	Hayashi A, Morikawa T, Kawai T, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M.
2014 年 5 月	Hum Pathol. 45(5):1045-56. 2014.	A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy.	Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y.
2014 年 5 月	PLoS One. 9(5):e96005. 2014	Direct evidence for pitavastatin induced chromatin structure change in the KLF4 gene in endothelial cells.	18) Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y.
2014 年 5 月	Blood. 123(25):3932-42. 2014	Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells.	Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC,

			Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T.
2014 年 5 月	Methods Mol Biol. 2014;1164:33-8.	Chromatin immunoprecipitation protocol for mammalian cells.	Komata M, Katou Y, Tanaka H, Nakato R, Shirahige K, Bando M.
2014 年 5 月	EMBO Rep. 15, 489-507 (2014).	Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy.	Hirose, T., Mishima, Y., Tomari, Y.
2014 年 5 月	Cancer Med. 2014 May 24.	Aberrant promoter methylation of PPP1R3C and EFHD1 in plasma of colorectal cancer patients.	Takane K, Midorikawa Y, Yagi K, Sakai A, Aburatani H, Takayama T, Kaneda A.
2014 年 6 月	Blood. 123(25):3932-42, 2014	Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells.	Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T.
2014 年 6 月	Sci Rep. 2014 Jun 24;4:5412.	PPAR β/δ activation of CD300a controls intestinal immunity.	Tanaka T, Tahara-Hanaoka S, Nabekura T, Ikeda K, Jiang S, Tsutsumi S, Inagaki T, Magoori K, Higurashi T, Takahashi H, Tachibana K, Tsurutani Y, Raza S, Anai M, Minami T, Wada Y, Yokote K, Doi T, Hamakubo T, Auwerx J, Gonzalez FJ, Nakajima A, Aburatani H, Naito M, Shibuya A, Kodama T, Sakai J.
2014 年 6 月	Nat Genet. 46(6):583-7. 2014	Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma.	Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S.
2014 年 6 月	Ann Surg Oncol. 2014 Jun;21(6):2105-12. doi: 10.1245/s10434-014-3503-2. Epub 2014 Feb 4. PubMed PMID: 24492923	Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer.	Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M.
2014 年 7 月	Cancer Sci. 105(8):974-82. 2014	Transforming growth factor- β -induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells.	Arase M, Horiguchi K, Ehata S, Morikawa M, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K, Koinuma D.

2014年7月	Hum Pathol. 45(7):1397-405. 2014	Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition.	Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y.
2014年7月	Cell Res. 24(8):994-1008. 2014	A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression.	Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K.
2014年7月	Nucleic Acids Res. 2014, 42(7): 4241-56.	MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters.	Okuda H, Kawaguchi M, Kanai A, Matsui H, Kawamura T, Inaba T, Kitabayashi I, Yokoyama A.
2014年7月	Mol Cell Biol. 2014 Oct 1;34(19):3702-20. doi: 10.1128/MCB.00099-14. Epub 2014 Jul 28.	The Hypoxia-Inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Provide a Mechanistic Link between Angiogenesis and Tumor Growth.	Ueda, J. Lee, K..L. Ho, J. Kitajima, S. Yang, H. Sun, W. Fukuhara, N. Zaiden, N. Chan, S.L. Tachibana, M. Shinkai, Y. Kato, H. and Poellinger, L*.
2014年8月	PLOS ONE 2014 Aug 21;9(8):e105394. doi: 10.1371/journal.pone.0105394.	Selenium-based S-adenosylmethionine analog reveals the mammalian seven-beta-strand methyltransferase METTL10 to be an EF1A1 lysine methyltransferase.	Shimazu, T. Barjau, J. Sohtome, Y. Sodeoka, M. and Shinkai, Y*.
2014年8月	J Biol Chem. 2014 Aug 25.	Genome-wide approaches reveal functional vascular endothelial growth factor (VEGF)-inducible nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 binding to angiogenesis-related genes in endothelium.	Suehiro JI, Kanki Y, Makihara C, Schadler K, Miura M, Manabe Y, Aburatani H, Kodama T, Minami T.
2014年9月	Epigenetics, 9(9): 1195-206. 2014.	Methylome, transcriptome, and PPAR γ cistrome analyses reveal two epigenetic transitions in fat cells.	Takada H, Saito Y, Mituyama T., Wei Z, Yoshihara E, Jacinto S, Downes M, Evans R.M, Kida Y.S.
2014年10月	Mol Endocrinol. 2014 Oct 20;me20141171. [Epub ahead of print]	Integrative analysis of FOXP1 function reveals a tumor suppressive effect in prostate cancer.	Takayama KI, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Takahashi S, Hommma Y, Urano T, Aburatani H, Inoue S.
2014年11月	Biochem Biophys Res Commun. 455(3-4):305-11. 2014	Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion.	Nakamura H, Nakashima T, Hayashi M, Izawa N, Yasui T, Aburatani H, Tanaka S, Takayanagi H.
2014年11月	Clinical and Translational 2014 Nov 22;3(1):61	Clinical initiatives linking Japanese and Swedish healthcare resources on cancer studies utilizing Biobank Repositories.	Toshihide Nishimura, Takeshi Kawamura, Yutaka Sugihara, Yasuhiko Bando, Shigeru Sakamoto, Masaharu Nomura, Norihiko Ikeda, Tatsuo Ohira, Junichiro Fujimoto, Hiromasa Tojo, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama, Roland

			Andersson, Thomas E Fehniger, Harubumi Kato and Gyorgy Marko-Varga.
2014年11月	Carcinogenesis. 35(11):2404-14. 2014	Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP α .	Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M and Koike K.
2014年11月	J Bone Miner Res. 2014 Nov 27. doi: 10.1002/jbmr.2418. [Epub ahead of print]	Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis.	Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, Masuda H, Tokuyama N, Nakamura S, Tsutsumi S, Yasuda H, Okamoto K, Takayanagi H, Hikita A, Imamura T, Matsuo K, Saito T, Kadono Y, Aburatani H, Tanaka S.
2014年12月	Nature Genetics 2014 46(12):1267-73.	Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes.	Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T.
2014年12月	Blood Cancer J. 12;4:e264. 2014	Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice.	Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Yoshida K, Enami T, Kamada Y, Kato T, Uchida K, Nanmoku T, Obara N, Suzukawa K, Sanada M, Nakamura N, Aburatani H, Ogawa S, Chiba S.
2014年12月	Exp Hematol. 2014 Dec 20. pii: S0301-472X(14)00814-5.	A C-terminal mutant of CCAAT-enhancer-binding protein α (C/EBP α -Cm) downregulates Csf1r, a potent	Togami K, Kitaura J, Uchida T, Inoue D, Nishimura K, Kawabata KC, Nagase R, Horikawa

		accelerator in the progression of acute myeloid leukemia with C/EBP α -Cm.	S, Izawa K, Fukuyama T, Nakahara F, Oki T, Harada Y, Harada H, Aburatani H, Kitamura T.
2014年12月	Methods Mol. Biol. 1262, 155-163 (2015).	Genome-wide co-localization screening of nuclear body components using a fluorescently tagged FLJ cDNA clone library.	Hirose, T., Goshima, N.
2015年1月	Blood. 125(2):358-69. 2015	Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells.	Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T.
2015年1月	Front. Biosci. 7, 1-47 (2015)	The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs.	Yamazaki, T., Hirose, T.
2015年2月	Oncotarget. 6(4):2263-76. 2015	RUNX1, an androgen- and EZH2-regulated gene, has differential roles in AR-dependent and -independent prostate cancer.	Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Urano T, Takahashi S, Homma Y, Aburatani H, Inoue S.
2015年2月	J Biol Chem. 2015 Feb 13;290(7):4163-77.	The FBXL10/KDM2B Scaffolding Protein Associates with Novel Polycomb Repressive Complex-1 to Regulate Adipogenesis.	Inagaki T, Iwasaki S, Matsumura Y, Kawamura T, Tanaka T, Abe Y, Yamasaki A, Tsurutani Y, Yoshida A, Chikaoka Y, Nakamura K, Magoori K, Nakaki R, Osborne TF, Fukami K, Aburatani H, Kodama T, Sakai J.
2015年2月	Am J Pathol. 185(2):550-62. 2015 Feb	Characterization of a New Small Bowel Adenocarcinoma Cell Line and Screening of Anti-Cancer Drug against Small Bowel Adenocarcinoma.	Suzuki H, Hirata Y, Suzuki N, Ihara S, Sakitani K, Kobayashi Y, Kinoshita H, Hayakawa Y, Yamada A, Watabe H, Tateishi K, Ikenoue T, Yamaji Y, Koike K.
2015年2月	Acta Neuropathol. 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]	Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment.	1) van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezeman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF.
2015年3月	Proc Natl Acad Sci U S A. accepted	SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies.	Kawaguchi T, Akie Tanigawa A, Naganuma T, Ohkawa Y, Souquere S, Pierron G, Hirose T.

(学会発表等)			
2010年10月 28日	第55回日本人類遺伝学会(大宮) 招待講演	Pancreatic Cancer Exomes	油谷浩幸
2010年10月 29日	第48回日本癌治療学会学術集会 JSCO-JCA joint symposium(京都) 招待講演	ゲノム・エピゲノム情報による 症例層別化	油谷浩幸
2010年11月 18日	41th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Basic and Clinical Frontiers of cancer epigenetics (Tokyo) 招待講演	Epigenomic analysis of liver cancer	Aburatani H.
2010年11月 27日	第15回中国分子病態研究会(岡山) 招待講演	エピゲノム解析による疾病研 究	油谷浩幸
2010年12月 1日	4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010; 岡崎)	Emerging functions of “modern” and “classical” noncoding RNAs in mammalian cells	Tetsuro Hirose
2010年12月 7日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸)	パラスペックル構造体を介し て制御される核内繫留 mRNA の解析	谷川明恵、横井崇秀、佐々 木保典、廣瀬哲郎
2010年12月 7日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸)	エクソソームによって分解さ れる二次構造保存ゲノムシン テニー領域由来非コード RNA 群の解析	迫田絵理、光山統泰、浅 井潔、廣瀬哲郎
2010年12月 7日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸)	U7 snRNP 新規構成タンパク 質によるヒストン遺伝子の転 写抑制機構	井手上賢、足達俊吾、夏 目徹、廣瀬哲郎
2010年12月 8日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸) 招待講演	Chromatin marks in Transcriptional regulation	油谷浩幸
2010年12月 8日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸) BMB2010 シンポジウム「エピ ゲノム情報のリードアウトと制 御」	Live cell imaging of epigenetic histone modifications.	Hiroshi Kimura
2010年12月 8日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸) ワークショップ	Noncoding RNA とタンパク質 の特異的相互作用による核内 構造体形成過程	廣瀬哲郎
2010年12月 8日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸)	核内パラスペックルに局在す るクロマチン再構築因子の解 析	川口哲哉、長沼孝雄、佐々 木保典、廣瀬哲郎
2010年12月 8日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸)	核内構造構築に必要な noncoding RNA の選択的 3' 末 端プロセシングの分子機構	長沼孝雄、中川真一、青 木一真、五島直樹、佐々 木保典、廣瀬哲郎
2010年12月 9日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸) 口頭発表	細胞分化過程における低 CpG プロモーターの組織特異的な 脱メチル化	永江玄太
2010年12月 10日	第33回日本分子生物学会年会(神 戸) ポスター発表	二次構造保存ゲノムシンテニ ー領域由来非コード RNA の 予測	光山統泰

2011年1月24日	国際シンポジウム: International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (淡路) 口頭発表	Hdac8 is a cohesion deacetylase that is required for recycling of cohesion.	白髭克彦
2011年1月26日	国際シンポジウム: International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (淡路)	Visualizing histone modification dynamics in living cells.	Hiroshi Kimura
2011年3月3日	3rd JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Liver Cancer Research (Maihama) 招待講演	Integrated genomic analysis of liver cancer	Aburatani H.
2011年4月12日	2011 Illumina Scientific Summit (Bali, April 11-14, 2011)	Epigenomic profiling	Hiroyuki Aburatani
2011年4月27日	臨床応用を目指した最前線セミナーPart.12 (4.27 東京)	多層的オミックス解析による診断と治療の標的分子の探索: その最新事情 ゲノム・エピゲノム解析	油谷浩幸
2011年4月30日	第100回日本病理学会総会シンポジウム (4.30 横浜)	がんトランスレショナル研究の最先端と病理」 エピゲノム修飾の包括的解析によるがん創薬・バイオマーカー探索	油谷浩幸
2011年5月19日	第5回日本エピジェネティクス研究会セミナー (5.19 熊本)	エピゲノム解析	油谷浩幸
2011年5月19日	第5回日本エピジェネティクス研究会年会 熊本	大腸癌における H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C の発現異常とその意義の検討	山本信三、立石敬介、山本恵介、工藤洋太郎、宮林弘至、毛利大、浅岡良成、伊地知秀明、砂河孝行、油谷浩幸、小池和彦
2011年5月19日	第5回日本エピジェネティック研究会年会	細胞分化過程における低 CpG プロモーターの脱メチル化	永江玄太
2011年5月26日	第11回日本分子生物学会春季シンポジウム、金沢	「ヒストンメチル化酵素 ESET による生命機能制御」	眞貝洋一
2011年6月11日	第16回東京肝臓シンポジウム (6.11 東京)	がんゲノム解析	油谷浩幸
2011年6月14日	hnRNP UL1 RNA2011, Kyoto,	U7 snRNP acts to repress histone gene transcription during cell cycle arrest through its new component, hnRNP UL1	Ideue, T., Adachi, S., Naganuma, T., Natsume, T., Hirose, T.
2011年6月14日	RNA2011, Kyoto,	Functional analysis of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in nuclear paraspeckle formation.	Kawaguchi, T., Naganuma, T., Sasaki, YF., Hirose, T
2011年6月15日	RNA2011, Kyoto,	MENβ Noncoding RNA-dependent and -independent Steps Required for Nuclear Paraspeckle Formation	Naganuma, T., Nakagawa, S., Kawaguchi, T., Aoki, K., Sasaki, YF., Goshima, N., Hirose, T

2011年6月15日	RNA2011, Kyoto,	Alternative 3' end processing of nuclear-retained long noncoding RNAs required for subnuclear body formation.	Naganuma, T., Sasaki, YF., Goshima, N., Hirose, T
2011年6月27日	International Symposium on Application of NGS on Genomics and Epigenomics (2011.6.27 台北)	Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma	Hiroyuki Aburatani
2011年6月29日	第63回日本細胞生物学会 札幌、2011.6.29	The building process of nuclear paraspeckles on the specific long noncoding RNAs.	Hirose, T.
2011年6月30日	第10回バイオテクノロジー国際会議 (6.30 東京)	がんエピゲノム創薬	油谷浩幸
2011年7月5日	第26回北摂循環器研究会(7.5 大阪)	エピゲノム解析の現状と疾患解析	油谷浩幸
2011年7月6日	国立国際医療研究センターセミナー (7.6 新宿)	次世代エピゲノム解析	油谷浩幸
2011年7月11日	5th ICGC Scientific Workshop (July 10-12, 2011, Kyoto)	Current Challenges & New Technologies	Hiroyuki Aburatani
2011年7月15日	IMSUT&RCAST GCOE symposium (7.15 Tokyo)	Regulatory genomics	Hiroyuki Aburatani
2011年8月11日	興和セミナー (8.11 興和研究所)	がんエピゲノム創薬	油谷浩幸
2011年9月3日	第6回肺癌分子病態研究会 (9.3.2011 東京)	次世代シーケンサーを用いた癌ゲノム解析：検体調製からデータ解析まで	油谷浩幸
2011年9月21日	第84回日本生化学会大会シンポジウム 京都、	非コードRNAの細胞内構造構築機能と疾患との接点	廣瀬哲郎
2011年10月6日	BioJapan2011 (10.6 横浜)	がんエピゲノム創薬	油谷浩幸
2011年10月8日	第61回日本体質医学会総会 (10.8 東京)	パーソナルゲノム解析がもたらすがん予防・治療戦略	油谷浩幸
2011年10月14日	バイオフィナンスギルド第10期第3回セミナー (10.14 東京)	エピジェネティクス・エピゲノムの研究最前線	油谷浩幸
2011年10月20日	第29回千駄木内分泌懇話会(10.20 東京)	エピゲノム解析とゲノム医療	油谷浩幸
2011年10月26日	US-Japan Cancer Genomics and Epigenomics Workshop (October 24-26, 2011 - Kyoto)	Genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency in pancreatic cancer	Hiroyuki Aburatani

2011年10月 27日	JSPS 164th committee 4th Kickoff Symposium (October 27, 2011, Tokyo)	Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma	Hiroyuki Aburatani
2011年10月 4日	第70回日本癌学会学術総会	ゲノム・エピゲノム情報による症例層別化	永江玄太
2011年10月 20日	Japan Digestive Disease Week 2011 福岡	大腸癌における H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C の発現異常とその意義の検討	山本信三、立石敬介、山本恵介、工藤洋太郎、浅岡良成、伊地知秀明、池上恒雄、砂河孝行、油谷浩幸、小俣政男、小池和彦
2011年11月 12日	第56回人類遺伝学会 シンポジウム 12 家族性腫瘍 (11/12 幕張)	がんゲノム診断	油谷浩幸
2011年11月 19日	第11回 Cardiovascular Frontier Conference (11/19 東京)	エピゲノム解析からせまる循環器研究	油谷浩幸
2011年11月 22日	がん研究所、東京	ヒストンリジンメチル化による生命機能制御	眞貝洋一
2011年11月 24日	International Scientific Coordination Network (November 22–25, 2011 – Montpellier, France)	Cancer genomics and epigenomics	Hiroyuki Aburatani
2011年11月 29日	FOCUS symposium (11/29/2011, Sendai)	Personalized oncology	Hiroyuki Aburatani
2011年11月 30日	2011 次世代シーケンサーセミナー (11/30 東京)	次世代ゲノム研究の最前線	油谷浩幸
2011年12月 7日	医科学政策研究会 (12/17 東京)	次世代ゲノム研究の最前線	油谷浩幸
2011年12月 10日	27th RBC-NIRS International Symposium. December 9-10, 2011, Kyoto, Japan	The role of H3K9 methyltransferase in genome integrity.	Tsubota, T. and Shinkai, Y.
2011年12月 13日	MBSJ2011 Workshop: Next generation molecular medicine (Yokohama)	Cancer genome sequencing	Hiroyuki Aburatani
2011年12月 16日	第34回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜	ESET-mediated endogenous retrovirus silencing	眞貝洋一
2011年12月 16日	日本分子生物学会年会 横浜	Multiple steps required for construction of nuclear paraspeckle on the specific long noncoding RNAs.	T. Hirose
2012年1月 14日	第5回肝がん分子標的治療研究会 (1/14 東京)	肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて	油谷浩幸

2012年1月18日	第10回 がん・エピゲノム研究会 (1/18 仙台・東北大)	エピゲノム解析とトランスレショナル研究	油谷浩幸
2012年1月25日	ゲノムテクノロジー第164委員会 沖縄分科会 (1/25 那覇)	パーソナルオンコロジーの実現へ向けて	油谷浩幸
2012年1月26日	OIST seminar (1/26 OIST)	Regulatory genomics	Hiroyuki Aburatani
2012年2月3日	第5回 iPS細胞・再生医学研究会 (2/3 京都大)	エピゲノム解析の現状&心筋分化のエピゲノム・ダイナミクス	油谷浩幸
2012年2月7日	精神・神経疾患研究開発費 平成23年度シンポジウム (2/7 東京)	ハイドロキシメチルシトシンの局在解析	油谷浩幸
2012年2月10日	研究成果報告会 (2/10 東京)	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	油谷浩幸
2012年2月23日	The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference (Bethesda, USA)	Methylation dynamics in cancer	Hiroyuki Aburatani
2012年2月9日	Interdisciplinary approaches for the study of senescence. Cambridge, UK	Small molecule screening for epigenetic modulators.	Hiroshi Kimura.
2012年3月2日	第6回新肝臓病研究会 (甲府)	肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて	油谷浩幸
2012年3月28日	Next Generation Sequencing Applications Asia (March 28-29, 2012, Singapore)	Cancer Genomics to Drug discovery	Hiroyuki Aburatani
2012年4月14日	第49回日本臨床分子医学会学術集会シンポジウム (京都)	がんエピゲノム創薬	油谷 浩幸
2012年5月10日	第21回 Research in Oncology セミナー (盛岡)	肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて	油谷 浩幸
2012年5月12日	第6回エピジェネティクス研究会	Genome-wide profiling of promoter methylation identifies distinct subgroups in hepatocellular carcinoma	Nagae G, Midorikawa Y, Tatsuno K, Tsuji S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Ishikawa S, Aburatani H
2012年5月14日	第6回 日本エピジェネティクス研究会年会 東京	悪性形質転換におけるヒドロキシメチル化シトシンの低下	Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Aburatani H, Koike K
2012年5月24日	平成24年度第3回東北大学病院がんセミナー (仙台)	Translation of cancer genome	油谷 浩幸
2012年5月28日	平成24年度東大医科研大学院セミナー (東京)	エピゲノム解析	油谷 浩幸

2012年6月1日	第327回C B I 学会研究講演会 (東京)	パーソナルオンコロジーへ向けてのゲノム情報解析	油谷 浩幸
2012年6月15日	第13回Pharmaco-Hematology シンポジウム (6.15 東京)	s i R N A / m i R N A 医薬の現状と課題	吉田 哲郎
2012年6月15日	第13回Pharmaco-Hematology シンポジウム (6.15 東京)	非コードRNAによる新しい制御機構 (その重要性と疾患との接点)	廣瀬 哲郎
2012年7月20日	第48回日本肝臓研究会 (金沢)	肝細胞癌の統合的ゲノム解析	油谷 浩幸
2012年8月11日	Front-J第3回学術集会 (東京)	エピゲノムのダイナミクス	油谷 浩幸
2012年8月29日	第102回発明教室 未来医療セミナー (金沢)	ゲノム医療の最前線	油谷 浩幸
2012年9月12日	Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Epigenetics & Chromatin	Cytosine methylation dynamics during hepatic differentiation	Nagae G, Shiraki N, Kamio A, Fujita T, Kume S, Aburatani H
2012年9月17日	19th International Mass Spectrometry Conference, September 15-21, 2012 in Kyoto Japan	Label-Free Semi-Quantitative Analysis of Histone Modification Dynamics using High-Resolution Mass Spectrometer	Kazuki Yamamoto, Yoko Chikaoka, Takeshi Kawamura, Takao Hamakubo, Tatsuhiko Kodama.
2012年9月19日	第71回日本癌学会学術総会 札幌	Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation.	Kudo Y, Tateishi K, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Aburatani H, Koike K.
2012年9月20日	71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (日本癌学会、札幌)	Genomics of Cancer Progression	油谷 浩幸
2012年9月20日	The 71th Japan Cancer Association Annual Meeting (International Session) Sept. 20, 2012, Sapporo (Japan).	Genome-wide profiling of promoter methylation identifies distinct subgroups in hepatocellular carcinoma.	Nagae G, Midorikawa Y, Tatsuno K, Tsuji S, Yamamoto S, Tsutsumi S, Ishikawa S, Aburatani H.
2012年9月25日	Yale Univ MB&B seminar (9.25 ニューヘイブン、米国)	The paraspeckle: the noncoding RNA-centered architecture for specific gene regulation	Tetsuro Hirose
2012年10月1日	「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第4回公開シンポジウム『バイオインフォマティクスの最前線』(横浜)	エピゲノム標識のダイナミクス	油谷 浩幸
2012年10月9日	RCAI Seminar Series: Toward Integrative Medical Biology (横浜)	Chromatin accessibility in cardiac mesoderm specification	油谷 浩幸
2012年10月11日	JDDW2012 (神戸)	Genomic Medicine towards personal oncology ゲノム医療：パーソナルオンコロジーの実現へ向けて	油谷 浩幸

2012年10月 11日	Sysmexセミナー（神戸）	ゲノム医療の実現へ向けて	油谷 浩幸
2012年10月 12日	BioJapan2012 JBIC ミニプレゼン テーション（横浜）	質量分析計を用いたエピジェ ネティックス研究とIT創薬	川村猛
2012年10月 17日	生命医薬情報学連合大会「がんと オミックス研究」（東京）	肝細胞癌の統合的ゲノム解析	油谷 浩幸
2012年10月 25日	日本人類遺伝学会第57回大会（東 京）	シンポジウム「エピジェネテ ィクス研究の新展開」エピゲ ノムマップ	油谷 浩幸
2012年10月 30日	BiWO2012（10.30 東京）	The paraspeckle: the noncoding RNA-centered nuclear body for gene regulation	Tetsuro Hirose
2012年11月 6日	International Symposium on genetic and epigenetic control of cell fate （京都）	Chromatin dynamics during cardiomyocyte differentiation	Hiroyuki Aburatani
2012年11月 9日	バイオフィナンスギルド第11期 第4回セミナー（11.9 東京）	Long noncoding RNA と疾患と の関わり	廣瀬 哲郎
2012年11月 22日	第7回日本質量分析学会北海道談 話会・講演会（旭川）	エピゲノム研究とプロテオミ クス	川村猛
2012年12月 15日	Advans 研究会	細胞分化過程におけるシトシ ン修飾のダイナミクス	永江 玄太
2012年12月 18日	第3回Tissue Arrayセミナー（徳島）	がんゲノム解析：パーソナル オンコロジーの実現へ向けて	油谷 浩幸
2012年12月 20日	AYRCOB (The Asian Young Researchers Conference on Computational and Omics Biology) 2012	Bisulfighter: Pipeline for Accurate Methylated Cytosine Calling	Tsuji J., Horton P., Mituyama T.
2013年1月 13日	2013年第1回TMS研究会講 演会（東京）	質量分析計によるヒストン修 飾解析	川村猛
2013年2月4 日	NSFC(中国)-JST（日本）共同ワー クショップ 臨床研究のためのゲ ノミクス（2.4 上海）	Impact of genomics on drug discovery - Non-coding RNAs: as potential drug targets and biomarkers-	Tetsuo Yoshida
2013年2月5 日	NSFC-JST Workshop on Genomics for Clinical Studies（上海）	Genomics of cancer progression	Hiroyuki Aburatani
2013年2月 12日	RIKEN-KI joint doctoral course 2013 （横浜）	Dynamics of chromatin accessibility	油谷 浩幸
2013年2月 12日	JBIC 研究成果報告会（東京）	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	油谷 浩幸

2013年2月 22日	AGBT 2013 (米国・Marco Island)	Integrated genomics of hepatocellular carcinoma genome	Hiroyuki Aburatani
2013年2月 18日	Lorne Genome Conference 2013 (2.18 ローン、オーストラリア)	Nuclear body formation during the long noncoding RNA biogenesis	Tetsuro Hirose
2013年4月 19日	エピゲノム・エピジェネティクス JST・NEDO 公開シンポジウム 東京	エピゲノム創薬へ向けてのオープンイノベーション	油谷 浩幸
2013年5月 10日	第14回分子複合医薬研究会	長鎖非コードRNA研究から見えてきた新しいゲノム機能	廣瀬 哲郎
2013年5月 30日	第7回エピジェネティクス研究会 (奈良)	Cytosine methylation dynamics during hepatic differentiation	永江玄太、白木伸明、神尾明日香、藤田隆教、糸昭苑、油谷浩幸
2013年6月 12日	第17回日本がん分子標的治療学会 学術集会 Year in review	がんゲノム解析と分子標的治療	油谷 浩幸
2013年6月 12日	61st ASMS Conference (Minneapolis, Minnesota, 米国)	Differentiation of Symmetric/Asymmetric dimethylated Arginine-containing Peptides using MALDI tandem Mass Spectrometry	Matthew Openshaw; Yuzo Yamazaki; Omar Belgacem; Takeshi Kawamura
2013年6月 14日	The 24th CDB Meeting Genomics and Epigenomics with Deep Sequencing	Bisulfighter: Accurate Detection of Methylated Cytosines and Differentially-Methylated Regions	Yutaka Saito, Junko Tsuji and Toutai Mituyama
2013年6月 18日	第4回富山ライフサイエンスシンポジウム 富山	がんゲノム情報から癌を理解する	油谷 浩幸
2013年6月	CNRS セミナー (ビルジュイフ、フランス)	Nuclear RNA granules : How the long noncoding RNA configures the intracellular structure?	Tetsuro Hirose
2013年9月 10日	The Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013 福岡	-Expanding Frontiers of Genomic Science- Chromatin remodeling in cardiomyocyte differentiation	油谷 浩幸
2013年9月 14日	日本生化学会年会シンポジウム (9.14 横浜)	Searching and functional analysis of subnuclear structures built on specific long noncoding RNA	Tetsuro Hirose
2013年9月 10日	第61回質量分析総合討論会シンポジウム (つくば)	エピゲノム創薬と質量分析	川村 猛・近岡洋子・山本一樹・山本竜児・浜窪隆雄・児玉龍彦
2013年9月 14日	HUPO 12th Annual World Congress (横浜)	Fill-in-the-Blanks on the List of Players in the Histone Code: Limitations of Conventional Pull-Down Proteomics and Efforts to Overcome the Difficulties	Kazuki Yamamoto, Gosuke Hayashi, Ryosuke Sakamoto, Takeshi Kawamura, Akimitsu Okamoto, Tatsuhiko Kodama
2013年10月 4日	第72回日本癌学会学術総会 横浜 Luncheon semina	Single cell transcriptome for Cancer Research	油谷 浩幸

2013年10月 4日	第72回日本癌学会学術総会 横浜	JHDM3C regulates sphere formation by mediating the crosstalk between Wnt and Notch pathways	Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Aburatani H, Omata M., and Koike K
2013年10月 5日	第72回日本癌学会学術総会 横浜 Symposium: Cancer Epigenomics	DNA demethylation and Cancer	油谷 浩幸
2013年10月 5日	第72回日本癌学会学術総会 横浜	Variable patterns of aberrant promoter methylation in clinical cancer tissues	Nagae G, Tsuji S, Aburatani H.
2013年10月 29日	日本バイオインフォマティクス学会 2013年大会	Bisulfighter: Accurate Detection of Methylated Cytosines and Differentially-Methylated Regions	Yutaka Saito, Junko Tsuji and Toutai Mituyama
2013年11月 2日	蛋白質研究所セミナー2013 大阪	DNA demethylation and Cancer	油谷 浩幸
2013年11月 20日	International Scientific Coordination Network (ISCN) November 20–23, 2013 – Toulouse, France	Integrated genomic analysis of hepatocellular carcinoma.	油谷 浩幸
2013年11月	日立中央研究所セミナー 国分寺	ゲノム情報と次世代生命科学 研究	油谷 浩幸
2013年12月 3日	第36回日本分子生物学会年会 神戸	Bisulfighter: Accurate Detection of Methylated Cytosines and Differentially-Methylated Regions	Yutaka Saito, Junko Tsuji and Toutai Mituyama
2013年12月 5日	第36回日本分子生物学会年会 神戸 ワークショップ	細胞系譜とエピゲノムダイナミクス「心筋細胞分化における協調的エピゲノム転	油谷 浩幸
2013年12月 5日	日本分子生物学会年会 ワークショップ (12.5 神戸)	Architectural role of long noncoding RNAs in vertebrates	Tetsuro Hirose
2013年12月 15日	日本生化学会年会シンポジウム (12.15 福岡)	Nuclear paraspeckle formation and function conducted by differentially regulated pathways for long noncoding RNA biogenesis.	Tetsuro Hirose
2014年1月 31日	分子予防環境医学研究会 和歌山	ゲノムデータから読み解く環境応答メカニズム	油谷 浩幸
2014年2月4 日	Keystone symposia, Stem cells and cancer, Feb. 4, 2014 (Banff, Canada)	Single cell transcriptome analysis of liver cancer stem cells, ,	Nagae G, Ito H, Tanaka S, Aburatani H.
2014年2月4 日	Keystone Symosia ‘Cancer Epigenetics’ (2014. 2.4. SantaFe, USA)	Genome-wide Analysis of Chromatin Status and Transcriptome in Response to Tumor Microenvironment.	Kondo A, Osawa T, Miyazawa T, Yoshida T, Aburatani H,

2014年2月 12日	AGBT2014 (Marco Island)	Single cell RNA sequencing reveals transition of cell populations with epigenomic switch in cell fate determination along cardiomyocyte differentiation.	油谷 浩幸
2014年3月 23日	第78回日本循環器学会学術総会 東京	Epigenomic Switch in Cardiomyocyte Differentiation	油谷 浩幸
2014年5月 14日	第62回質量分析総合討論会 1A-01 2014.5.14-16 大阪	「ヒストン翻訳後修飾解析のためのシステム開発」	川村 猛、近岡洋子、山本一樹、横井靖人、深町幸宏、福田哲也、比毛浩、児玉龍彦
2014年5月 14日	IIAS Research Conference 2014, Chromatin Decoding, International Institute for Advanced Studies, Kyoto, Japan. May 14, 2014.	Characterization of non-histone lysine methylation by a synthetic cofactor	Tadahiro Shimazu and <u>Yoichi Shinkai</u> .
2014年6月 11日	細胞生物学会シンポジウム (2014年6月11日、奈良)	ノンコーディング RNA による核内構造体形成機構	廣瀬哲郎
2014年6月 17日	日経バイオテクセミナー Single Cell Biology(東京 6/17/2014)	一細胞トランスクリプトームと細胞分化	油谷 浩幸
2014年6月 27日	国立遺伝学研究所研究会(三島 6/27/2014)	「表現型と遺伝子型のミッシングリンクをつなぐ - ゲノムダイナミクスによる遺伝子発現の質的・量的制御 -」 Cooperative epigenomic switch during cardiomyocyte differentiation	油谷 浩幸
2014年7月4日	第57回日本腎臓学会学術集会 (東京 7/6/2014)	「腎疾患領域における薬物療法の新たな展開」エピゲノム制御	油谷 浩幸
2014年7月 29日	エーザイ筑波研究所セミナー (筑波 7/29/2014)	がん医療とゲノム・エピゲノム異常	油谷 浩幸
2014年8月 24日	20th International Mass Spectrometry Conference. TPS17-08. August 24-29, 2014 Geneva Switzerland.	Discrimination between symmetry/asymmetry dimethylation on histone H4R3: their cell cycle dependent dynamics.	Takeshi Kawamura, Yoko Chikaoka, Yuzo Yamazaki, Matthew Openshaw, Omar Belgacem, Kazuki Yamamoto, Tatsuhiko Kodama.
2014年9月9日	Cold Spring Harbor Asia Conference (9/9/2014)	Systems Biology of gene regulation & genome editing Cooperative epigenomic switch during cardiomyocyte differentiation	油谷 浩幸
2014年9月 12日	WuXi seminar (9/12/2014)	Cancer genomics: genomic landscape of liver cancer	油谷 浩幸
2014年9月 17日	ESF-EMBO meeting 'Long Regulatory RNA' (2014. 9. 17, Pultusk, Poland)	The common mechanism underlying assembly of the nuclear granules on the architectural noncoding RNAs	Hirose T.

2014年9月 25日	日本癌学会総会 (横浜 9/25/2014)	Mutation in chromatin remodeling complex genes and cancer	油谷 浩幸
2014年9月 25日	73th Japan Cancer Association Annual Meeting (International Session) Sept. 25, 2014, Yokohama (Japan).	The TET1 promotes malignant characteristics by aberrant enhancer hydroxymethylation in hepatocellular carcinoma.	Nagae G, Aburatani H.
2014年9月 25日	第73回日本癌学会学術総会 (2014年9月25日、横浜)	Genome-wide Analysis of Chromatin Status and Transcriptome in Response to Tumor Microenvironment、腫瘍微小環境におけるゲノムワイドなクロマチン及び遺伝子発現解析	Kondo A, Osawa T, Ueda H, Nakaki R, Shimamura T, Yamamoto S, Yoshida T, Aburatani H.
2014年9月 26日	日本癌学会総会アジレントセミナー (横浜 9/26/2014)	微量がん臨床検体解析	油谷 浩幸
2014年10月 17日	第87回日本生化学会大会シンポジウム (京都 10/17/2014)	血中遊離 DNA を用いた腫瘍ゲノム解析	油谷 浩幸
2014年10月 22日	15th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) International Conference, Taipei, Oct 22, 2014.	Characterization Of Non-Histone Lysine Methylation By A Synthetic Cofactor	Yoichi Shinkai.
2014年10月 24日	ゲノムテクノロジー第164委員会第46研究会 (仙台 10/24/2014)	「次世代ゲノム解析の最前線」大規模がんゲノム解析 Beyond exome	油谷 浩幸
2014年11月 4日	Join Australia and Japan joint meeting 2014 (2014. 11. 4, Sydney, Australia)	The possible common mechanism underlying assembly of the nuclear bodies on architectural long noncoding RNAs.	Hirose T.
2014年11月 6日	22nd Endocrine Bay Seminar (横浜 11/6/2014)	遺伝子転写制御：発生・疾患とのリンク	油谷 浩幸
2014年11月 19日	The 4th Japan-France Cancer Workshop (Kyoto 11/19/2014)	Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer	Aburatani H.
2014年11月 22日	第59回人類遺伝学会 (東京 11/22/2014)	「進展するがんゲノミクス・エピゲノミクス研究」大規模がんゲノム解析	油谷 浩幸
2014年11月 27日	第37回日本分子生物学会 (横浜 11/27/2014)	Chromatin remodeling complex gene mutations in cancer	油谷 浩幸
2014年12月 15日	協和キリン研究所セミナー (東京 12/8/2014)	がん医療とゲノム・エピゲノム異常	油谷 浩幸
2014年12月 15日	Bioinformatics Week in Odaiba, CBRC2014.	Methylome, transcriptome, and PPAR γ cistrome analyses reveal two epigenetic transitions in fat cells.	Takada H, Saito Y, Mituyama T., Wei Z, Yoshihara E, Jacinto S, Downes M, Evans R.M, Kida Y.S.

2015年1月13日	Joint symposium on TGF-b family and cancer (Tsukuba 1/13/2015)	Coordinated chromatin regulation by developmental signals during cardiomyocyte differentiation	Aburatani H.
2015年1月13日	Systems Biology of Liver Cancer (RIKEN Yokohama 1/21/2015)	Integrative genomic analysis of human hepatocellular carcinoma	Aburatani H.
2015年2月5日	慶應義塾大学 SKIP セミナー(東京 2/5/2015)	細胞運命制御とエピゲノム転換	油谷 浩幸
2015年3月8日	第21回神経芽腫研究会(埼玉がんセンター 3/8/2015)	がんゲノム情報にもとづく精密医療	油谷 浩幸

<特許出願>

出願日	出願番号	発明等の名称	出願人
2012年2月29日	特願2012-44324 (国内優先権: 特願2012-205775; 2012年9月19日) PCT/JP2013/054961	肝細胞癌由来の癌細胞の存否の判定方法、判定用マーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2012年9月19日	特願2012-205756 (国内優先権: 特願2013-113430; 2013年5月29日) PCT/JP2013/075335	肝細胞癌に関する情報の取得方法、ならびに肝細胞癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2012年9月19日	特願2012-205762 (国内優先権: 特願2013-113436; 2013年5月29日) PCT/JP2013/075334	大腸癌に関する情報の取得方法、ならびに大腸癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2012年9月19日	特願2012-205767 PCT/JP2013/075336	脳腫瘍に関する情報の取得方法、ならびに脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2012年9月19日	特願2012-205769 PCT/JP2013/075337	子宮体癌に関する情報の取得方法、ならびに子宮体癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2012年11月16日	PCT/JP2013/080878	抗癌治療に用いられる長鎖非コードRNA (61/727185 2012.11.16)	国立大学法人東京大学 協和発酵キリン株式会社
2013年2月26日	EP13755864	METHOD FOR DETERMINING PRESENCE OR ABSENCE OF CANCER CELL DERIVED FROM HEPATOCELLULAR CARCINOMA, AND	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学

		DETERMINATION MARKER AND KIT	
2013年5月29日	特願2013-113419 (国内優先権: 特願2014-093759; 2014年4月30日)	肝細胞癌に関する情報の取得方法、ならびに肝細胞癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2013年5月29日	特願2013-113425 (国内優先権: 特願22014-093771; 2014年4月30日)	大腸癌に関する情報の取得方法、ならびに大腸癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年5月28日	US 14/288,996	COMPUTER READABLE MEDIUM FOR ENABLING A COMPUTER TO CARRY OUT PROVISION OF INFORMATION ON COLON CANCER AND MARKER AND KIT FOR OBTAINING INFORMATION ON COLON CANCER	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年5月28日	US 14/289,097	COMPUTER READABLE MEDIUM FOR ENABLING A COMPUTER TO CARRY OUT PROVISION OF INFORMATION ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND MARKER AND KIT FOR OBTAINING INFORMATION ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年5月28日	EP14170193	Method for obtaining information on hepatocellular carcinoma and marker and kit for obtaining information on hepatocellular carcinoma	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年5月28日	EP14170195	Method for obtaining information on colon cancer and marker and kit for obtaining information on colon cancer	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年7月10日	特願2014-142494	肺癌に関する情報の取得方法、ならびに肺癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年7月10日	特願2014-142497	子宮体癌に関する情報の取得方法、ならびに子宮体癌に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2014年7月11日	特願2014-143326	複数種類の癌に関する情報を取得する方法、システムおよびプログラム	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2015年3月31日	特願2015-073577	乳がんに関する情報の取得方法、ならびに乳がんに関する情報を取得するためのマーカー及び乳がん検出用キット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学

2015年3月31日	特願2015-073592	婦人科がんに関する情報の取得方法、ならびに婦人科がんに関する情報を取得するためのマーカー及び婦人科がん検出用キット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2015年3月31日	特願2015-073624	胃がんに関する情報の取得方法、ならびに胃がんに関する情報を取得するためのマーカー及び胃がん検出用キット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学
2015年4月8日	特願2015-079254	卵巣がんに関する情報の取得方法、ならびに卵巣がんに関する情報を取得するためのマーカーおよびキット	シスメックス株式会社 国立大学法人東京大学

以上