

機関番号：33910  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21710211  
 研究課題名（和文） バイオインフォマティクスによるがん疾患診断手法の開発と治療標的遺伝子探索  
 研究課題名（英文） Development of cancer diagnosis method and investigation of therapeutic target by using Bioinformatics  
 研究代表者  
 高橋 広夫 (TAKAHASHI HIRO)  
 中部大学・応用生物学部・講師  
 研究者番号：30454367

## 研究成果の概要（和文）：

申請者は以前よりがん診断マーカー抽出のための新バイオインフォマティクス手法の開発を行ってきたが、本研究では、新手法により抽出された遺伝子を標的とした、新しい抗がん剤の開発を行った。また、従来では、困難であった診断遺伝子セット評価法の開発を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we developed new bioinformatics method on the basis of two methods, genetic algorithm and permutation test, and we investigated new candidates of anticancer drugs for therapeutic targets extracted by bioinformatics.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム情報科学

キーワード：医療・福祉、バイオマーカー、癌、細胞・組織、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

近年の急速な DNA チップ技術の発展により、生命現象の解明や洗練された疾患診断・治療に期待されており、DNA チップを用いたバイオインフォマティクス手法の開発と、その新しい手法の応用が急務であるが、未だ発展途中である。

## 2. 研究の目的

本研究では、新しいバイオインフォマティクス手法の開発・改良と、バイオインフォマティクス手法により抽出されたバイオマーカーの実験的な検証を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

**(1)食道がんの悪性度と関連する FOXA1 の発見と FOXA1 下流遺伝子 LOXL2 を標的としたがん抑制効果の検証**

申請者が以前開発した新バイオインフォマティクス手法 Modified signal-to-noise (S2N) 法を、食道がんの遺伝子発現データ(国立がんセンターとの共同研究)に応用した。そして、抽出されたマーカー遺伝子 FOXA1 の下流遺伝子 LOXL2 に対する *in vitro* でのがん転移抑制効果を検証した。

(i) 国立がんセンターに来院された胃がん症例 35 症例について、アフメトリックス社

の U95A version 2(12533 プローブセット)を用いて、遺伝子発現データを取得した。前処理として、各サンプルのシグナル値のトリム平均値を 1000 になるようにスケーリングし、35 症例間で Present call が、5 人以上の症例で見られる遺伝子を選択し、8,172 遺伝子まで絞り込み、さらに、(95%パーセンタイルシグナル値-5%パーセンタイルシグナル値)が 1,000 以上になる遺伝子を選択し、4,477 遺伝子まで絞り込んだ。Present call は、各遺伝子のが  $p < 0.04$  で発現している事を表している。

さらにこの 35 症例のデータを、24 症例の N5 群(リンパ節転移 5ヶ所以上)と 11 症例の N0 群(リンパ節転移なし)にわけ、S2N'法(式 1)を適用した。

$$S2N' = \frac{|\mu_{class1} - \mu_{class2}|}{\min_{i \in C}(\sigma_{class i})} \quad (1)$$

(ii) (i)で抽出された *FOXAI* の下流遺伝子 *LOXL2* 遺伝子をターゲットとして食道がん細胞株 TE3 を用いた RNAi による転移阻害実験を行った。転移阻害実験には、BD 社製の BioCoat Matrigel Invasion Chamber を用いて測定した。

## (2)軟部腫瘍の悪性度と相関する *MIF*, *SCD1* の *in vitro*, *in vivo* での抑制効果の確認

申請者が以前開発した遺伝子発現データから遺伝子をフィルタリングする手法射影 PART (projective adaptive resonance theory, 適応共鳴理論)法と診断モデル構築をする BFCS 法 (boosted fuzzy classifier with SWEEP operator, ブースト化ファジィ分類器法)を組み合わせた PART-BFCS 法により抽出された軟部腫瘍におけるバイオマーカー遺伝子 *MIF* と *SCD1* をターゲットとして抑制することにより *in vitro*, *in vivo* における がん抑制効果を検証した。

(i) *in vitro* における軟部腫瘍細胞株 MUSS を用いて阻害剤により *MIF*, *SCD1* を抑制して、がんの浸潤能の効果を調べた。転移阻害実験には、BD 社製の BioCoat Matrigel Invasion Chamber を用いて測定した。

(ii)マウス C57BL/6 を使った *in vivo* の系で、阻害剤を用いて *MIF* を阻害し抗腫瘍効果を調べた。メラノーマ細胞株 B16F10 細胞をマウスに  $1.0 \times 10^6$  cells/100 $\mu$ l で接種し、腫瘍が成長したところで、*MIF* 阻害剤と、コントロールとして溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO)を投与し、3 週間の経過観察を行った。

## (3)遺伝的アルゴリズムとパーミュテーション

## ン検定の組み合わせによる遺伝子セット評価法の開発

がんなどの疾患は、単一の遺伝子が原因の場合は稀であり、複数の原因遺伝子が組み合わさって発症する。従来は、抽出された単一の遺伝子を評価する統計手法が主流であるが、本研究では、遺伝的アルゴリズム(Genetic Algorithm, GA)とパーミュテーション検定を組み合わせることで、現実的な解析時間で、遺伝子セットに対する  $p$  値を算出する。本研究では、モデル構築法には、単純な線形判別法を用いた。

(i) 国立がんセンターに来院された軟部腫瘍症例 35 症例について、アフィメトリックス社の U133A(22384 プローブセット)を用いて、遺伝子発現データを取得した。前処理として、各サンプルのシグナル値のトリム平均値を 1000 になるようにスケーリングし、(95%パーセンタイルシグナル値-5%パーセンタイルシグナル値)が 1,000 以上になる遺伝子を選択し、8,806 遺伝子まで絞り込んだ。

この 35 症例は、軟部腫瘍の中でも、悪性線維性組織球腫と呼ばれるタイプのがんであるが、さらに、粘液型(myxofibrosarcoma, MFS) 15 症例、多形型(pleomorphic malignant fibrous histiocytoma, MFH) 20 症例にわけた。MFH と MFS は、同じ悪性線維性組織球腫でありながら、予後が大きく異なる上に病理学的に鑑別が難しいことから、診断マーカーを見つけて出すことは重要であり、また、新しい治療標的遺伝子を探すことは、予後を改善するために大変重要である。

(ii)パーミュテーション検定を行うためには、患者ラベルをランダムに 10,000 回程度並べ替えて、帰無分布を構築することになる。8,806 遺伝子に対して、2 遺伝子セットを抽出するためには、合計で  ${}_{8806}C_2 = 38,768,415$  の組み合わせが存在するが、これを網羅的に、検定するためには、 $10,000 \times 38,768,415$  ( $\approx 3.9 \times 10^{11}$ )回の並べ替えが必要になるため、遺伝的アルゴリズムによる高速化を応用した。

## 4. 研究成果

### (1) (i) *FOXAI* の発見

国立がんセンターの食道がんの遺伝子発現データに S2N'を適用したところ表 1 のような結果が得られた。

### (ii) *FOXAI* の下流遺伝子 *LOXL2* の発見と *in vitro* における TE3 細胞の転移抑制効果

表 1 の 13 位として抽出されている *FOXAI* を RNA interference (RNAi)法により阻害することで、*LOXAI* が抑制でき(図 1)、さらに、*LOXL2* を RNAi 法で抑制することで TE3 細胞の浸潤能を低下させた(図 2)

(2)(i)軟部腫瘍において悪性度と相関する *MIF*, *SCD1* の *in vitro* での浸潤能抑制効果

軟部腫瘍細胞株 MUSS に対して、阻害剤により *MIF*, *SCD1* を抑制し、*in vitro* におけるを用いて転移能抑制効果を調べたところ図3のように、*MIF*, *SCD* 共に抑制効果が認められた。

(ii)軟部腫瘍において悪性度と相関する *MIF* の *in vivo* での抑制効果

メラノーマ細胞接種から、18日目で、図4のように、腫瘍抑制効果が得られた。

表 1 食道がんの発現データにおける遺伝子の S2N'順位

S2N' Rank	Gene symbol
1	CALB1
2	TFF3
3	KRT7
4	SCGB1A1
5	FABP4
6	ITSN2
7	LOC728320 /// LTF
8	ADH1A
9	CLDN10
10	LTBR
11	SETD1B
12	ENO2
13	FOXA1
14	NCAPD2
15	MAL
16	NEBL
17	GDF15
18	ZNF384
19	MME
20	CEACAM5

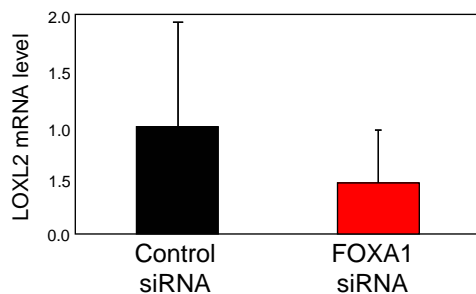


図 1 *FOXA1* 阻害による *LOXL2* の発現抑制

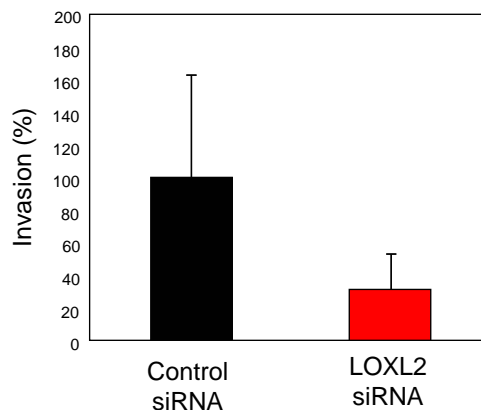


図 2 *LOXL2* 阻害による TE3 細胞の転移抑制

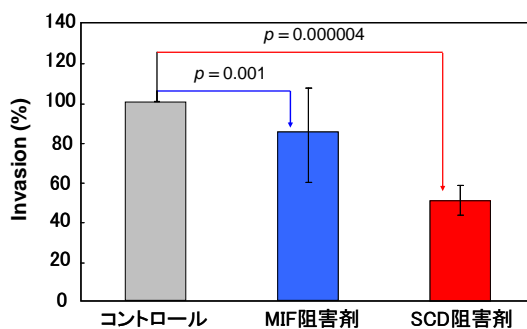


図 3 MUSS における *MIF* 阻害剤と *SCD* 阻害剤による がん浸潤抑制効果

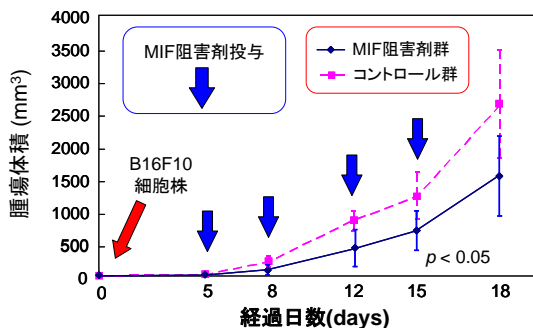


図 4 メラノーマ細胞株を用いた *in vivo* における *MIF* 阻害効果

(3)遺伝的アルゴリズムとパーミュテーション検定の組み合わせによる遺伝子セット評価法の開発

本研究では、2 遺伝子セット抽出という条件で、シミュレーションを実行した。網羅的な方法で解析を試みたが、現実的な時間で、計算が起こらないと推測されたために、一部計算させて、推定計算時間を算出したところ 540 万時間であった。それに対して、申請者の提案する手法では、約 120 時間で計算が終わった。計算に必要な時間は、2 遺伝子セッ

ト抽出かつ線形判別分析と言う条件の下で、4.5万倍に高速化された。

新手法では、表2のように、2遺伝子セット *MIF*, *MNI* のセットが上位1位として抽出され、期待通り遺伝子セットに対する *p* 値が算出できた。また上位2位のもは、6組抽出された。*p* < 0.05 の遺伝子セットは合計で7セットを抽出できた。*MIF* との組み合わせが多かった。以前の申請者の PART-BFCS 法の解析からも、*MIF* が、マーカー遺伝子として、抽出されていたが、今回の結果も、同様に *MIF* が抽出された。また、今回は、*MIF* との遺伝子セットとしていくつか新しい遺伝子候補が選択された。これらの遺伝子のうち、*meningioma (disrupted in balanced translocation) 1 (MNI)* は遺伝子髄膜腫の原因遺伝子の一つであり、急性骨髄性白血病発症を促進させることが分かっている。*TOLLIP (toll interacting protein)* は炎症、免疫細胞の制御、生存、増殖に関与する TLR (toll-like receptors) シグナル経路を負に制御することが分かっている。このようにがんに関連のある遺伝子が抽出出来た。これらの遺伝子も、*MIF* と同様に治療標的になる可能性が高い。

表2新手法により抽出された軟部腫瘍の診断マーカーセットとその *p* 値

遺伝子セット		<i>p</i> 値
MIF	MNI	0.0082
MIF	TOLLIP	0.042
MIF	SCYA3	0.042
MIF	CRKL	0.042
TIMP3	OGFR	0.042
COL5A2	DPH1	0.042
C1GALT1C1	HUWE1	0.042

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Sano, M. Aoyagi, K. Takahashi, H. Kawamura, T. Mabuchi, T. Igaki, H. Tachimori, Y. Kato, H. Ochiai, A. Honda, H. Nimura, Y. Nagino, M. Yoshida, T. Sasaki, H.: "Forkhead box A1 transcriptional pathway in KRT7-expressing esophageal squamous cell carcinomas with extensive lymph node metastasis" *Int. J. Oncol.* 36(2), 321-330 (2010) 査読有

- ② Matsuo, N. Mase, H. Makino, M. Takahashi,

H. Banno, H.: "Identification of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1-upregulated genes during in vitro shoot regeneration" *Plant Biotechnol.* 26(4), 385-393 (2009) 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 丸井誠堂・小塩高広・高橋広夫・小林猛、「遺伝子セット抽出評価のための遺伝的アルゴリズムと並び替え検定を使用した手法の開発」第76回化学工学会年会、東京農工大学、2011年3月22-24日(震災により開催中止、発表は成立)
- ② 森達也・田部記章・丸田隆典・横山国大・佐藤信雄・高橋広夫・吉村和也・重岡成「Identification of genes whose alternative splicing events are regulated by an Arabidopsis serine/arginine-rich-related protein, atSR45a, in response to high-light stress using a tiling microarray」第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日
- ③ 横山国大・石川裕基・森達也・田部記章・丸田隆典・佐藤信雄・高橋広夫・吉村和也・重岡成「Analysis of alternative splicing mechanism regulated by an Arabidopsis ASF/SF2-like serine/arginine-rich protein, atSR30, in response to high-light stress」第33回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2010年12月7-10日
- ④ H. Takahashi: New simple and practical gene filtering approach, modified signal-to-noise filtering method, European Biomarkers Summit 2009, Barcelona, Spain, 2009年11月5-6日
- ⑤ 青柳一彦・佐野正行・高橋広夫・馬渕智子・藤田剛・井垣弘康・日月裕司・本多裕之・落合淳志・吉田輝彦・佐々木博己「食道扁平上皮がんの悪性度と相関するリンパ節転移のFOXA転写経路を介した新たな分子機構」第68回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2009年10月1-3日
- ⑥ M. Iwasaki, H. Iwakawa, H. Takahashi, Y. Ueno, I. Pekker, Y. Eshed, S. Kojima, Y. Machida and C. Machida: The AS2 regulates leaf polarity by repressing ETT/ARF3 in Arabidopsis. Auxins and Cytokinins in Plant Development - Third International Symposium. Prague, Czech Republic, 2009年7月10-14日

- ⑦ A. Nakagawa, H. Takahashi, N. Sato, S. Kojima, B.-Y. Cha, J.-T. Woo, Y. Machida, and C. Machida : Arabidopsis DNA contains very few putative G-quadruplex sequence motifs. In Proceedings of the 20th International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh, the United Kingdom, 2009年6月30日-7月4日

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 広夫 (TAKAHASHI HIRO)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号 : 30454367