

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290070

研究課題名(和文) 癌パスウェイマーカの同定と治療応用の研究

研究課題名(英文) Identification and clinical application of pathway-based markers for cancer

研究代表者

田中 博 (Tanaka, Hiroshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：60155158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本年度、主に2つの研究を行った。1つは、肝細胞がんでの主要29遺伝子のパスウェイを文献情報に基づいて作成し、肝細胞がんの患者の遺伝子発現情報と組み合わせで解析した。さらに、遺伝子機能分類(GO)を用いた部分ネットワークの解析を行い、治療における有効性部分ネットワークの確認を行った。2つ目は、昨年から継続している癌の浸潤・転移に関わる上皮間葉転換の解析を行うため、細胞株でのより詳細な時間間隔での時系列の遺伝子発現情報を測定し、非負値行列特異値分解により、4つの特徴的な成分を抽出することができた。各時期の主要転写因子を更に絞り込むことで、転移阻害剤の開発に繋がる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We conducted two studies. First, we collected a major molecular pathway for hepatocellular carcinoma (HCC) including 29 genes based on literature review, and network analyses were performed in combination with the gene expression profiles of HCC patients. Furthermore, we applied our network analysis method to the Gene Ontology (GO) terms to identify candidate subnetworks effective for the treatment of HCC. Second, we also conducted gene expression analysis of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and measured the more intensive time point of EMT gene expression profile, to investigate the detailed process of cancer invasion and metastasis. Using non-negative matrix factorization (NMF), we identified four major component, namely, monotonic increase, monotonic decrease, early response, and intermediate state. Further analysis of master regulators in each component identify candidates for the development of anti-metastasis drugs.

研究分野：生命情報学 がんシステム生物学 システム分子医学

キーワード：上皮間葉転換 がん転移 遺伝子発現プロファイル Waddington地形 ARACNe がんパスウェイ

## 1. 研究開始当初の背景

がんの死亡の90%は、がん転移による。にもかかわらず、がん転移を防ぐ抗がん剤にまだまだ有効なものはない。これは、がん転移過程を制御しているのは、これまでのがんの分子標的薬のように、対象が単一あるいは少数のがん遺伝子ではなく、がん転移過程が細胞分子ネットワークの大規模な「構造変換」であるため、複数の遺伝子が相互作用的に関与する現象であるからである。また、このような細胞分子ネットワークの大局的な構造変化を捉える方法論がこれまで存在しなかったこともがん転移の研究が飛躍的に進むことがなく、そのための有効な阻害薬剤が開発されなかった理由でもある。したがって、これまでのように少数のがん遺伝子を対象とする方法論ではなく、がんという分子ネットワークシステムの全体的な構造変換を、大局的に取り扱える方法論が必要である。

## 2. 研究の目的

がんの転移に関しては近年、上皮間葉転換 (EMT: epithelial mesenchymal transition) という細胞型の変換が本質的な過程として注目を集めている。我々は、昨年度は、網膜色素上皮細胞について TGF- $\beta$  添加後、自動的に EMT を起こす性質を利用して、EMT 過程の時系列的な遺伝子発現プロファイル変化を観測し、その遺伝子発現プロファイル変化の本質的過程およびそれから推定される細胞内分子ネットワークの「構造変化」を系統的に捉えて、EMT を基本的に駆動する主要転写制御因子 (master regulator) を同定し、今後の抗転移薬の開発戦略を探索する。

EMT の本質を捉えるためには、個々の分子に注目する方法は有効性を期待できず。細胞の発生過程に関係する細胞内分子ネットワークの構造変化を大局的に捉える方法論の開発が必要である。我々は、遺伝子発現プロファイルの全ての可能性を集めた「状態空間」を考え、複雑系から発展した病態力学系アプローチにより、「状態空間」内での EMT に伴う細胞状態の遷移の軌跡を解析し、がん転移すなわち、上皮細胞型から間葉細胞型への転換の本質的構造を動的な状態空間内の軌跡と捉え、その本質を探究し、抗がん転移薬剤開発の方針を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 「病態力学系」理論としての「分子ネットワーク空間」の導入

病態力学系を表現する枠組みとして、< 「分子ネットワーク活動」の各状態を、集めて枚挙する「分子ネットワーク」の「状態空間」を考え、疾患の進行をその空間内の軌跡として表す > 「分子ネットワーク空間」アプローチを構築した。その後、文献調査によっ

て、同じ概念であるが、Hung や Wang らが、数理的にこれを導出する方法を提示していたことを見出したが、彼らの方法は、数学モデルを使用するもので、現在のところ単純な2遺伝子系での理論解析くらいしかできず、現実の医学には役立たない。著者らの方法は、具体的ながんの転移過程の取り扱える方法であったので、ガンの転移過程に応用した論文を発表した (Tanaka et al. J. Molecular cell biology (2015), 7(3); 253-266 )。

分子ネットワークの活性状態の空間「GRN空間」の構築

分子ネットワーク自体の構造はどの細胞でも同じで、ゲノムによって先天的にコードされているが、細胞でのその時点の状態によって、ネットワークのどの分子が活性化しているか (発現しているか) は異なっている。このように分子ネットワークの活性化のパターンを網羅的に集めた「状態空間」を考え、それを遺伝子発現調節ネットワーク状態の「状態空間」の意味で「GRN空間」と名付ける。

GRN空間の統計的頻度分布と準ポテンシャル分布

GRN空間の各状態は、生命系によってどの程度頻繁にその状態を発現するか、によって、各GRN状態の統計頻度分布がGRN空間内に定義でき、それぞれのピークに当たる発現パターンは細胞型の典型的な発現プロファイルを示す。

この統計的頻度分布をとすると、この頻度分布からそれぞれのGRN状態の停留し易さを表す準ポテンシャルがボルツマンの以下の関係を利用して定義できる。すなわち 
$$P_i = -k \log \pi_i$$
 である。このようにして「状態の停留し易さを準ポテンシャルで表したGRN空間」が定義できる。細胞の状態の推移は、この準ポテンシャルの定義されたGRN空間のなかの軌跡として記載できる。この準ポテンシャル地形は、かつて発生学者 Waddington が提案した「Waddington エピジェネティック地形」と等価な概念であり、我々は、「準ポテンシャルの定義されたGRN空間」を「quantified Waddington Epigenetic Landscape (qWEL)」と呼んでいる。

### (2) WEL空間を用いたガンの転移過程のオートクチャー解析

がんの転移の基本過程としての「上皮間葉転換 (epithelial - mesenchymal transition)」と EMT 過程の軌跡を表す GRN 部分空間の構築

がんの転移過程をこの GRN 空間内の軌跡として表現するにあたって、その本質的過程である EMT 過程の時系列的な遺伝子発現プロファイル・データを収集した (Takahashi et al. JBC (2010) 285, 4060-4073)。まず、EMT 過程の軌跡を記載するために、GRN 空間の部分空間を決定した。このために、遺伝子発現データベース GEO や ArrayExpress から上皮状態と間葉状態を表す遺伝子発現プロ

ファイル・データの事例をできるだけ多数集め、両者が可及的に分離できる遺伝子を選んで部分空間を定義した。合計 61 の遺伝子が選ばれた。この部分空間で EMT 軌跡を描画するためには 3 次元表示が必要であり、主成分分析により 2 次元の座標系へと次元圧縮し、その上に準ポテンシャルを表示した。因子負荷量より、第 1 成分は E と M 状態を区別する一般的な遺伝子を集めたもの、第 2 主成分はがんの転移に関する遺伝子を集めたものと判断された。軌跡描画用 GRN 部分空間はこの第 1 - 2 主成分を軸とした部分 GRN 空間で行った。

EMT 過程の部分空間内の軌跡と軌跡主成分分析の結果

高橋らの EMT 過程の遺伝子発現時系列プロファイルは、網膜色素上皮細胞のセルラインに TNF- と TGF- を添加して誘導した EMT データで、添加時 (0 時間) と添加後 1 時間、6 時間、16 時間、24 時間、42 時間、60 時間後の計 7 時点のデータがある。この状態をさらに主成分分析とクラスター分析をかけた。

今年度は、高橋らの遺伝子発現プロファイル・データより、さらに時間間隔を詳細にした実験を行った。0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 24, 42, 60 時間後の 12 時点である。また主成分分析だけでなく今年度は、非負値行列特異値分解をも用いて主成分分析の結果を検証した。

がん転移 3 段階の遺伝子発現調節ネットワークの構造変化と主調節遺伝子の変化

EMT の過程を、遺伝子発現調節ネットワークの構造変化として解明するために、時系列的な遺伝子発現プロファイルから細胞内分子ネットワークを推定した。推定アルゴリズムとしては ARACNe を用いた。

### (3) 一般的な肝細胞がんのパスウェイ解析

以上の EMT の本質的な解析の研究と同時に今年度は、肝細胞がんを対象を絞って、パスウェイのモデル化や部分ネットワークへの分解法など、臨床に活用できる「癌パスウェイ解析」の手法も開発した。

## 4. 研究成果

### (1) がん転移過程の qWEL 空間での軌跡

描かれた EMT 軌跡の主成分分析・クラスター分析によって、新しい知見が得られた。それは EMT において上皮細胞状態 (E) から間葉細胞状態 (M) 直接移行するのではなく、一旦中間段階 (I: intermediate) を経て、転移することを見出した。EMT が E-I-M 転換をすることが遺伝子発現プロファイル上明瞭であり、かつ中間段階も準安定状態であることは、準ポテンシャル地形からも明らかである (図 1 参照)。

EMT 過程は、3 つの状態に分離できた。ま

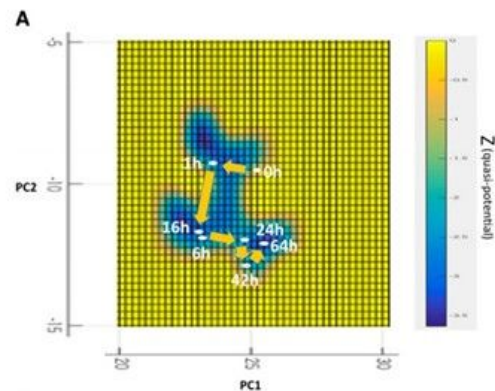


図 1 「病態力学系」より見たがん転移のアトラクター表示 (GRN 部分空間を上から眺めた軌跡)。E から I へ状態遷移してから方向を変え M に移行する。

た、それぞれの準ポテンシャル値を計算し、ポテンシャル地形上の EMT 軌跡を描くことができた EMT 過程の遺伝子発現プロファイルを測定し、それを「状態空間」内にプロットすると上皮細胞型のバシンから間葉細胞型のバシンへの直接アトラクター遷移するのではなく、6.16 時間の時点で、「中間段階」に途中滞在することが明らかになった。

変え M に移行する。

この状態の解釈であるが、陳-合原らの健康から疾病への臨界的過渡状態 (critical transition) とも考えられるし、また一旦幹細胞状態への戻っているとも考えられる。今後のより詳細な分析が期待される。

今年度は、方法で述べたように、さらに詳細に測定したが同様に成果が得られ、4 時間後、5 時間後、6 時間後、8 時間後、12 時間後、

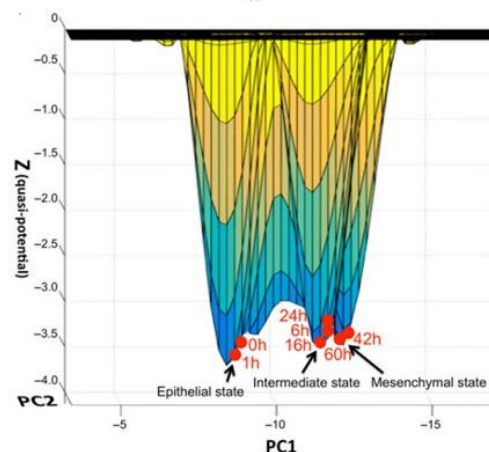


図 2 「病態力学系」より見たがん転移のアトラクター表示 (GRN 部分空間を 3 次的に眺めた軌跡)。E から I へ状態遷移してから次に M のバシンに移行する。

16 時間後の 7 時点でやはり上皮細胞状態および間葉細胞状態でもない「中間状態」を取ることが明らかになった。

すなわち、がん転移を過程は、上皮細胞型から「中間細胞」型へ遷移し、そこで細胞ネ

ネットワーク構造をさらに変換して、間葉細胞型への転換を起こすことが明らかになった（「がん転移の3段階論」）。この中間状態は「幹細胞」状態とも、間葉細胞への「臨界的遷移への構造変化準備状態」とも考えられた。

#### (2) EMT 過程での遺伝子発現調節ネットワークの構造変化

EMT 過程で、遺伝子発現調節ネットワークは3つの段階に構造変化することが見出された。E 状態から I 状態に移行する過程で、上皮細胞マーカー遺伝子発現の抑制をされているが、M 状態へ移るところで、陳 - 合原の Dynamic Biomarker 理論に従った臨界的過渡状態で働く特徴的な遺伝子発現が見られた。また、マスター調整転写因子として ZEB1-SMAD2 が主要な段階移行を司る転写因子として同定された。

#### (3) 肝細胞がんのモデルと部分ネットワーク同定方法

肝細胞癌での主要 29 遺伝子のパスウェイを文献情報に基づいて作成し、肝細胞がんの患者の遺伝子発現情報と組み合わせで解析した。さらに、遺伝子機能分類(GO)を用いた部分ネットワークの解析を行い、治療における有効性部分ネットワークの確認を行った。

#### (4) がんの転移阻害のシステム創薬

がん転移過程 EMT の病態力学系アプローチによって大局的ながん転移の過程が3段階を踏むことがわかった。それゆえ、がんの転移を防ぐ薬剤は、上皮細胞段階から中間段階へ移行する過程を阻害する薬剤を開発すればよいことが分かる。本研究では、ZEB1、カテニン系が主要な系で、この系をブロックするシステム創薬による抗がん剤の開発が今後進展することを期待する。

#### <引用文献>

Tanaka H, Ogishima S, Network biology approach to epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: three stage theory, Journal of Molecular Cell Biology, 7(3), 2015, 253-266

#### 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 1 件)

Tanaka H, Ogishima S, Network biology approach to epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: three stage theory, Journal of Molecular Cell Biology (査読有), 7(3), 2015, 253-266  
DOI: 10.1093/jmcb/mjv035

#### 〔学会発表〕(計 3 件)

Tanaka H, Integration of Genomic and Phenomic Information in Medicine -

Tohoku Medical Megabank Experience - , Seoul National University Hospital (SNUH) Cancer Symposium 2016, 2016 3. 25, Seoul National University Auditorium, Seoul, Korea

Tanaka H, Deep whole genome sequencing Japanese healthy population, The 5th annual translational bioinformatics conference (TBC2015), 2015, 11.9, Bellesalle Nishi-Shinjuku, Tokyo, Japan

Tanaka H, Complex systems theory of cancer metastasis, The 5th annual translational bioinformatics conference (TBC2015), 2015, 11.8, , Bellesalle Nishi-Shinjuku, Tokyo, Japan

#### 〔図書〕(計 1 件)

田中博、日本評論社、生命進化のシステムバイオロジー、2015、225 頁

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 〔その他〕

ホームページ

<http://ngbrc.com/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 博 (Tanaka Hiroshi)  
東京医科歯科大学難治疾患研究所・非常勤講師

研究者番号：60155158

##### (2) 研究分担者

田中 真二 (Tanaka Shinji)  
東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子腫瘍医学・教授

研究者番号：30253420

森岡 勝樹 (Morioka Katuki)  
東京医科歯科大学難治疾患研究所・助教  
研究者番号：30351589

茂櫛 薫 (Mogushi Kaoru)  
順天堂大学大学院医学系研究科ゲノム・再  
生医療センター・助教  
研究者番号：60569292

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：