

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21555

研究課題名（和文）四重鎖核酸の動態攪乱に対するがん細胞選択的脆弱性の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis for cancer cell-specific vulnerability to disturbance of G-quadruplex dynamics

研究代表者

清宮 啓之（SEIMIYA, Hiroyuki）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：グアニン四重鎖（G4）と呼ばれる高次核酸構造は、ゲノムの維持継承および機能発現を様々なかたちで制御する。G4を認識して安定化するG4リガンドと呼ばれる化合物は、特定のがん細胞に対してのみ、強い制がん効果を発揮する。本研究では、G4リガンドの作用機序としてDNA損傷の誘導のみならず、特定タンパク質群の生合成の抑制を見出した。さらに、G4リガンドのがん細胞増殖抑制効果を増強する遺伝子変異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化医療が進歩しつつある現代においては、優れた制がん活性を有する化合物が得られたとき、それが具体的にどのような特徴をもったがんに有効であるのかを事前に予測する技術・手法が求められる。本研究では、有望な創薬シーズであるG4リガンドの制がん作用機序を明らかにするとともに、有効性が期待できるがんの特徴の一端を捉えることができた。これらの成果は、核酸の「かたち」を標的としたがん種横断的なプレジジョン医療に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：G-quadruplex (G4), a higher-order nucleic acid structure, regulates the genome maintenance and functions in various ways. Chemical compounds, called G4 ligands, which recognize and stabilize G4s, exert potent therapeutic effects only on specific ranges of cancer cell lines. In this study, we found that not only induction of DNA damage but also repression of biosynthesis of specific proteins work as the modes of action for G4 ligands. Furthermore, we identified genetic mutations that enhance the antiproliferative effects of G4 ligands on cancer cells.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：グアニン四重鎖 がん テロメア 薬物療法

1. 研究開始当初の背景

(1) グアニン四重鎖 (四重鎖核酸) の安定化による制がん

直鎖状染色体の末端に位置するテロメア DNA の反復配列 5'-(TTAGGG)_n-3' は、生理的濃度の一価イオン (K⁺もしくは Na⁺) の存在下において、グアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) と呼ばれる高次立体構造を形成する。G4 は、テロメア以外でも概ね (G₂₋₄X₁₋₇)₄ を満たすグアニンリッチなゲノム塩基配列で形成され、ヘリカーゼなどの働きによって解消されると理解されている。G4 の解消不全は DNA 複製や RNA 転写の妨げとなり、また、ゲノム不安定性を誘起する。G4 は RNA でも形成され、タンパク質の翻訳にも影響を与えることが知られている (Wolfe et al. *Nature*, 2014; 研究代表者らの未発表データ)。一方、G4 は細胞内の特異的なタンパク質によって認識されることで、複製や転写をむしろ促進する例も報告されている。

研究代表者らは、放線菌 *Streptomyces anulatus* 3533-SV4 由来の G4 安定化化合物 (G4 リガンド) テロメスタチンおよびその合成誘導体類が、テロメアなどで複製ストレスや DNA 損傷を誘導し、神経膠芽腫の難治性の一因であるがん幹細胞を選択的に殺傷することを報告してきた (Miyazaki et al. *Clin Cancer Res*, 2012; Nakamura et al. *Sci Rep*, 2017)。さらに、種々の G4 リガンドが (1) 様々な臓器由来のヒトがん細胞 50 株のうち、難治がんである肺がん・膵がん・神経膠芽腫を含む約 3 割のがん細胞株に対してのみ、強い増殖抑制効果を発揮すること;

(2) ヒトがん細胞株を移植した免疫不全マウスの *in vivo* 治療モデルにおいて、大きな毒性を与えることなく制がん効果を発揮することを見出した。これらのことから、G4 リガンドに対して高い感受性 (hyper-sensitive) を示すがん細胞では、正常細胞を含むその他の細胞と比較して何らかのシステム変換 (例として特定のシグナル経路への依存化など) をきたしており、このシステムに G4 の動態攪乱 (=過度な安定化) に対する脆弱性が潜んでいると推定される。しかしながら、その実態は不明である。

(2) テロメア DNA は何故、TTAGGG の繰り返しなのか?

テロメアには染色体末端を保護する役割があり、DNA 複製に伴うテロメアの短縮は細胞老化を誘導する。およそ 80~90% のがん細胞はテロメア合成酵素テロメラーゼを活性化しており、テロメアを伸長維持することで無限に分裂増殖することが可能である。研究代表者らは、これまでに種々のテロメラーゼ阻害剤を同定・開発し、その制がん効果を非臨床レベルで実証してきた (Seimiya et al. *Cancer Cell*, 2005; Fujiwara et al. *Sci Rep*, 2018 など)。上述の G4 リガンドはテロメラーゼ阻害剤の一種であり、とりわけ神経膠芽腫幹細胞の増殖を強く抑制し、*in vivo* でも制がん効果を発揮した。最近さらに、膵がん等に対する制がん効果も見出したが、これらのがん選択的作用の詳しい分子機序は不明である。

テロメア配列はヌクレオソーム形成に要するエネルギーが高く、その一部は G4 を形成すると推定される。上述の通り、G4 は複製や転写の障壁となるが、テロメア配列は進化の過程で淘汰されず高度に保存されていることから、G4 は何らかの合目的的意義を持つと推定される。事実、研究代表者らは、テロメアから転写された TERRA と呼ばれる非コード RNA もしくはこれを模倣する合成オリゴ核酸が G4 を形成し、自然免疫系・インターフェロン標的遺伝子群の発現を抑制することを見出している (Hirashima et al. *Mol Cell Biol*, 2013; Hirashima & Seimiya, *Nucleic Acid Res*, 2015; reviewed in Okamoto & Seimiya, *Cells*, 2019)。さらに、G4 はテロメアの長さ依存した遺伝子発現調節にも関与することが、研究代表者らを含む国内外のグループにより報告されている (reviewed in Okamoto & Seimiya, *J Biol Chem*, 2019)。以上の背景と経緯から研究代表者らは、G4 は生物学的に重要な機能を持ち、ある種のがん細胞ではこの構造の安定化に伴って増殖・生存システムの脆弱性が露呈すると推定した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的・達成目標

上記の背景を踏まえ、本研究ではテロメスタチンなどの G4 リガンドに超感受性を示すがん細胞株の生存・増殖システムに刻み込まれた、「G4 の動態攪乱 (安定化) に伴って露呈する細胞脆弱性」の本質に迫る。具体的な達成目標は、以下の 2 点である。第 1 に、G4 リガンド超感受性のがん細胞は、ゲノムの維持継承 (複製・修復) および機能発現 (転写・翻訳) の作動様態にどのような特徴をもつのか、を明らかにする。第 2 に、上記で明らかにした特徴のうち、G4 リガンド、すなわち G4 の安定化によって細胞の生存・増殖システムを破綻に導く脆弱点を突き止め、その具体的な分子作用メカニズムを明らかにする。

本研究によって得られる成果は、従来のゲノム・エピゲノム研究の軸である核酸の「塩基配列」や「化学修飾」でなく、核酸の『形態 (かたち)』によるゲノム機能制御を提唱するばかりでなく、革新的がん創薬シーズとしての G4 リガンドの作用機序の理解ならびに効果予測診断への応用につながるものと期待される。

(2) 挑戦的研究としての意義

これまでのゲノム・エピゲノム研究は、核酸の「塩基配列」と「化学修飾」に基づく生命・疾患原理を紐解いてきた。一方、核酸の「形態」については、G4 形成配列の増幅が神経変性疾患に繋がること (Haeusler et al. Nature, 2014) などが報告されているが、核酸形態の恒常性を維持する仕組みや、その破綻による疾患発症の詳細原理は十分理解されていない。G4 形成配列はヒトゲノムに約 37 万ヶ所存在するとされ、G4 は DNA および RNA の双方で形成されることから、セントラルドグマの全般に影響を及ぼすと推定される。では、G4 安定化に対して特定のがん細胞のみが脆弱性を示すのは何故か。この問いに答え、その根底をなす G4 本来の生物学的意義を読み解くには、ゲノム全体を構造的・機能的システムとして捉え直すアプローチが必要である。これらの背景に基づく本研究構想は、がんのアキレス腱を捉えるための腫瘍生物学・治療学の方向を、(1) 核酸の「配列・化学修飾」のみならずその「形態」の意義の理解へ；(2) 遺伝子からタンパク質のいずれかの各論でなくそれら全ての連動的理解へ、と大きく転換させる潜在性を有する。本研究はこれらのコンセプトから、挑戦的研究として従来の枠組みとは全く異なる生命作用原理を紐解き、がんの本態に隠された未踏の脆弱性に迫る。上述の通り、がん細胞の G4 リガンド超感受性は臓器横断的に観察されているが、類似の現象として、ミスマッチ除去修復機能欠損がんはその由来臓器を問わず、免疫チェックポイント阻害薬が有効である (Le et al. Science, 2017)。がん薬物療法は「適応がん種 (もしくは癌腫)」という概念を離れ、分子異常に基づく「プレジジョン医療」へと変貌しつつある。G4 リガンドに超感受性を示すがん細胞の分子基盤を詳らかにすることで、核酸の「かたち」を標的としたプレジジョン医療への道が拓かれると期待される。

3. 研究の方法

(1) 薬剤感受性試験

96 ウェルマイクロプレートにヒト培養がん細胞株を播種し、種々の濃度の G4 リガンド (テロメスタチン、Phen-DC3、オキサゾールテロメスタチン誘導体など) を 2~6 日間曝露させた。テロメスタチンは産業技術総合研究所の新家一男博士、オキサゾールテロメスタチン誘導体は東京農工大学の長澤和夫教授より分与いただいた。MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) もしくは CellTiter-Glo 試薬を用いて細胞数を定量するとともに、50%増殖阻害濃度 (GI50 値) を算出した。

(2) 免疫蛍光染色

カバースリップ上に播種したがん細胞株を G4 リガンド存在下で培養し、2%のパラホルムアルデヒド溶液で固定後、0.5% Nonidet P-40 溶液で透過処理を行った。一次抗体および蛍光標識二次抗体を順次反応させたのち、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 含有 Vectashield マウンティングメディウムを添加した染色細胞を CCD カメラ付き蛍光顕微鏡で観察した。

(3) ウェスタンブロット解析

Whole cell extract 溶解緩衝液を用いて全細胞抽出液を調製し、タンパク質量を定量した。一定量のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルを Immobilon-P メンブレンに転写した。同メンブレンについて目的のタンパク質を認識する抗体を用いてウェスタンブロットを行い、当該タンパク質の特異的シグナルを検出した。

(4) 試験管内翻訳アッセイ

5'非翻訳領域もしくは open reading frame 領域に G4 形成配列もしくは G4 非形成配列を配置した遺伝子コンストラクトを構築した。これらの試験管内翻訳は、TnT T7 coupled reticulocyte lysate system を用いて実施し、反応産物をウェスタンブロットもしくは Dual-Glo ルシフェラーゼアッセイにて解析した。

(5) 小分子干渉 RNA (siRNA) による遺伝子ノックダウン

6 ウェルプレートに播種したがん細胞株に対し、Lipofectamine RNAiMAX トランスフェクション試薬を用いて標的遺伝子に対する siRNA もしくは陰性対照 siRNA を導入した。72 時間の培養後、タンパク質もしくは RNA を抽出し、それぞれウェスタンブロットもしくは逆転写-定量 PCR 解析によりノックダウン効率を確認した。

(6) 逆転写-定量 PCR 解析

Fast Gene RNA Basic Kit を用いて細胞から RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。このサンプルについて、LightCycler 96 システムを用いて定量 PCR 解析を行い、標的遺伝子の転写産物を定量した。

(7) iTRAQ プロテオーム相対定量解析

G4 リガンドを 48 時間処理したがん細胞株のペレットを回収し、液体窒素で急速凍結したサンプルについて iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) プロテオーム相対

定量解析を行った。タンパク質抽出およびトリプシン消化されたサンプルを iTRAQ 試薬で標識したのち、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析によりタンパク質の同定および相対定量解析を実施した。

(8) その他

その他の各種実験は、標準的な分子細胞生物学的手法および材料を用いて実施した。統計解析は Prism ソフトウェアを用いて実施した。

4. 研究成果

(1) G4 リガンド超感受性がん細胞株における DNA 損傷応答

様々なヒト臓器由来のがん細胞 50 株のうち、テロメスタチン、Phen-DC3、オキサゾールテロメスタチン誘導体などの G4 リガンド処理によっていずれも増殖が強く抑制される 14 種類のがん細胞株を選別し、DNA 損傷応答を観察するために免疫蛍光染色を行った。その結果、これらの G4 リガンド処理によって 53BP1 や γ H2AX などの DNA 損傷応答因子の核内フォーカスが顕著に誘導されるがん細胞株が 6 種類同定された。これらのがん細胞株の薬剤応答性は、G4 リガンドがゲノム DNA 上の G4 を安定化して複製ストレスや DNA 損傷を誘導するというこれまでの知見 (Miyazaki et al. Clin Cancer Res, 2012; Hasegawa et al. BBRC, 2016; Nakamura et al. Sci Rep, 2017) と一致すると判断された。一方、G4 リガンドを処理しても DNA 損傷応答が生じない残りのがん細胞株 8 種類においては、陽性対照として DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドを処理した場合には、顕著な DNA 損傷応答が観察された。したがって、これら後者のがん細胞株は、DNA 損傷応答機構を保持しつつも、G4 の安定化による DNA 損傷に対しては耐性であり、G4 リガンドは別の作用機序を介してこれらの細胞株の増殖を抑制しているものと考えられた。

(2) がん細胞株における G4 形成量、遺伝子変異と G4 リガンド感受性の相関解析

抗 G4 抗体 BG4 を用いた免疫蛍光染色により、39 種類のヒトがん細胞株 (=G4 リガンド感受性細胞株および耐性細胞株を含む) の核内における G4 形成量を定量した。その結果、G4 の形成量と発現が逆相関する遺伝子として、複数のテロメア関連因子および DNA 複製関連因子が同定された。一方、G4 の形成量と G4 リガンドに対する感受性 (GI50 値)、および G4 の形成量と DNA 損傷応答性 (上述の核内フォーカス形成) との間には、明確な相関は認められなかった。先行知見としては、G4 の解消に寄与するヘリカーゼのひとつである FANCD1 タンパク質の機能低下が、細胞の G4 リガンド感受性を高めることが報告されている (Wu et al. Mol Cell Biol, 2008)。したがって、G4 リガンドの細胞増殖抑制効果は、標的細胞内の G4 の形成量そのものよりも、G4 の形成と解消の動態によって規定される可能性が考えられた。次に、43 種類のヒトがん細胞株のエクソームデータと G4 リガンド感受性の相関解析を実施した。その結果、G4 リガンド感受性と正の相関を示す遺伝子変異を複数同定した。これらの遺伝子変異は、DNA もしくは RNA 上における G4 の安定化に対して合成致死的 (synthetic lethal) に働くことで細胞脆弱性をもたらす可能性が示唆された。

(3) G4 リガンドの DNA 損傷非依存的な作用機序

上述の(1)で同定された DNA 損傷非依存的な G4 リガンド高感受性がん細胞株において、(2)で同定した合成致死候補因子群の遺伝子発現を siRNA によりノックダウンした。その結果、ノックダウンにより上述の種々の G4 リガンドに対する細胞の感受性を増大させる、新規合成致死因子 X を見出した。対照として、因子 X のノックダウンは、G4 リガンド以外の細胞傷害性抗がん剤、ゲムシタビンおよびパクリタキセルの細胞増殖抑制効果は増強しなかった。さらに、G4 リガンドの DNA 損傷非依存的な制がん効果の分子メカニズムとして、G4 形成配列を有する mRNA からタンパク質への翻訳が抑制されることが明らかとなった。Phen-DC3 やテロメスタチンを処理したがん細胞のプロテオーム解析を行ったところ、これらの G4 リガンドで減少するタンパク質は、遺伝子のコード鎖 (センス鎖) における G4 形成配列の密度が有意に高いことが明らかとなった。以上より、G4 リガンドは DNA 損傷を誘導するのみならず、特定のタンパク質の生合成を抑制することで制がん効果を発揮している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Moyret Lalle Caroline, Prodhomme Melanie K, Burllet Delphine, Kashiwagi Ayaka, Petrilli Virginie, Puisieux Alain, Seimiya Hiroyuki, Tissier Agnes	4. 巻 in press
2. 論文標題 Role of EMT in the DNA damage response, double strand break repair pathway choice and its implications in cancer treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyata Kenichi, Imai Yoshinori, Hori Satoshi, Maruyama Reo, Fujii Risa, Ueda Koji, Jiang Li, Zheng Hao, Toyokuni Shinya, Sakata Toyonori, Shirahige Katsuhiko, Kojima Ryosuke, Nakayama Mizuho, Oshima Masanobu, Nagayama Satoshi, Seimiya Hiroyuki, Hirota Toru, Saya Hideyuki, Hara Eiji, Takahashi Akiko et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences USA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2025647118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mashima Tetsuo, Wakatsuki Takeru, Kawata Naomi, Jang Myung-Kyu, Nagamori Akiko, Yoshida Haruka, Nakamura Kenichi, Migita Toshiro, Seimiya Hiroyuki, Yamaguchi Kensei	4. 巻 11
2. 論文標題 Neutralization of the induced VEGF-A potentiates the therapeutic effect of an anti-VEGFR2 antibody on gastric cancer in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94584-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Seimiya Hiroyuki, Nagasawa Kazuo, Shin-ya Kazuo	4. 巻 74
2. 論文標題 Chemical targeting of G-quadruplexes in telomeres and beyond for molecular cancer therapeutics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 617 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00454-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiya Naoyuki, Oku Yusuke, Ishikawa Chie, Fukuda Tsutomu, Dan Shingo, Mashima Tetsuo, Ushijima Masaru, Furukawa Yoko, Sasaki Yuka, Otsu Keishi, Sakyo Tomoko, Abe Masanori, Yonezawa Honami, Ishibashi Fumito, Matsuura Masaaki, Tomida Akihiro, Seimiya Hiroyuki, Yamori Takao, Iwao Masatomo, Uehara Yoshimasa	4. 巻 112
2. 論文標題 Lamellarin 14, a derivative of marine alkaloids, inhibits the T790M/C797S mutant epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1963 ~ 1974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Kyoko, Okamoto Keiji, Okabe Sachiko, Fujii Risa, Ueda Koji, Ohashi Kenichi, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 G quadruplex forming nucleic acids interact with splicing factor 3B subunit 2 and suppress innate immune gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 65 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12824	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Mizuho, Ma Yue, Okabe Sachiko, Wakabayashi Yuki, Su Dongdong, Chang Young-Tae, Seimiya Hiroyuki, Tera Masayuki, Nagasawa Kazuo	4. 巻 56
2. 論文標題 Target identification of a macrocyclic hexaoxazole G-quadruplex ligand using post-target-binding visualization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12905 ~ 12908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc04957c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Seimiya Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Crossroads of telomere biology and anticancer drug discovery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3089 ~ 3099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Chuya, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 531
2. 論文標題 G-quadruplex in cancer biology and drug discovery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Seimiya H
2. 発表標題 Targeting G-quadruplex nucleic acids for cancer therapeutics
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清宮啓之
2. 発表標題 テロメアから始まるがん創薬
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	Univ de Lyon	Institut Curie		
米国	Univ Texas MD Anderson Cancer Center			
中国	Beijing University of Technology			
韓国	Institute for Basic Science	Pohang Univ Science and Technology		
フランス	Cancer Research Center of Lyon			