

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650154

研究課題名(和文) 癌上皮間葉転換における癌アトラクターの解明

研究課題名(英文) Clarification of Cancer Attractor of Cancer Epithelial Mesenchymal Transition

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・教授

研究者番号：60155158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん転移の機序である上皮間葉転換(EMT)の理解を目指して、細胞のすべての発現パターンを包摂した「細胞状態空間」上で上皮細胞と間葉細胞の各細胞状態の安定性を表す準ポテンシャル分布を計算し、がんのEMT過程の軌跡を求めた。

その結果、EMTは上皮細胞のpotential basinから直接に間葉細胞 basinに移動するのではなく、一旦、安定な中間状態(臨界的状態あるいは幹細胞状態と思われる)を経て間葉細胞に移行することが分かった(EMTの3段階論)。また、EMT過程の遺伝子発現プロファイルから推定した遺伝子ネットワークの構造変化から、遺伝子ネットワーク上でも3段階に変化することを確認した。

研究成果の概要(英文)： In order to understand the mechanism of EMT, we created the state space covering all the possible gene expression patterns and introduced a quasi potential distribution showing the stability of each state in this state space. Then we depicted the trajectory of state change during cancer EMT. We found that EMT exhibits 3 stages, where intermediate stage is thought to be a critical transient state or the stem cell state. We estimated the structural change of gene network during EMT, by applying the inference algorithm to gene expression profiles during EMT, and found structural change of gene network reflected the three stage transition of cancer EMT process.

研究分野：がんのシステム医学 ネットワーク解析

キーワード：上皮間葉転換 遺伝子ネットワーク がん転移 臨界状態 幹細胞状態

1. 研究開始当初の背景

がんの死亡の約 90% は、がんが転移することによる。がんの撲滅を目標に掲げる限り、がんの転移のメカニズムを解明し、抗転移薬を開発することが、喫緊である。

しかし、がんの転移はこれまでは、転移現象が様々ながんで多様な姿を呈していたため、統一的・原理的な把握が困難であった。この現状を改変するものとして、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) の概念が提案された。この概念は、研究開始当初の頃は、がんの転移現象を明らかにする統一的なメカニズムを提示するのではないかと期待されていたが、EMT もその現象は多様であり、これを捉える理論も明確ではなかった。我々は、EMT を動的システム論からとらえる見方を提示することによって、本質的な EMT の性質を明らかにするアプローチが有効ではないかと思い、本研究を提案し、研究を推し進めた。

2. 研究の目的

がん転移のメカニズムの本質的過程を明らかにするために、がん転移の主要な機構と考えられている EMT を、非線形力学の立場から細胞発現状態空間内のアトラクター遷移としてとらえ、ネットワーク医学の立場から本質的特徴を捉えることを目的とする。

細胞発現状態空間において、上皮細胞状態・間葉細胞状態とも健常時は安定な細胞状態 (細胞型) であり、細胞発現状態空間に各状態の安定度を表す準ポテンシャルを導入すると、ポテンシャルの窪み (potential basin) に両状態とも存在する。がん転移における EMT とは、がんの進行に伴って、細胞が上皮細胞状態の basin からゲノムの不安定性によって、エピゲネティック障害を越えて、間葉細胞の basin に遷移することである。

本研究では、これを単なる計算機シミュレーションやメタファーで終わることなく、実際の EMT 現象の実験データを用い、経験的に準ポテンシャル地形を描いて、その状態遷移を定量的に表現する方法を提案した。またこのような実験的遺伝子発現プロファイル・データから細胞内での遺伝子ネットワークの構造変換を調べるため、推定アルゴリズム ARACNe を用いて遺伝子ネットワークが EMT の過程でどう構造変化するかを追跡した。

3. 研究の方法

(1) 細胞発現状態空間の構築

2 万数千ある遺伝子の発現パターンは、近年の GEO などのデータベースに収録されている (約 70 万件)、その中で上皮細胞、間葉細胞の発現プロファイルのデータを選び、主成分分析を行って変動の大きい成分を軸にし

た状態空間を構成する。

(2) 細胞発現状態空間での準ポテンシャル分布の導入

この細胞状態空間に、各状態の安定性を表す準ポテンシャルを導入する。導入の方法は、それぞれの状態空間の点に関して GEO の大量データからの標本データを集め、状態空間内に頻度分布 () を描く。この頻度分布をから、準ポテンシャル分布 () をボルツマンの公式

$$= -k \log \quad (k \text{ は比例定数})$$

にしたがって負対数変換で、求める。このようにして細胞発現状態空間内に、準ポテンシャル分布を導入する。我々はこの経験的に導入した準ポテンシャル分布を「定量的 Waddington Epigenetic 地形」、略して qWEL と呼ぶ。

(3) EMT 軌跡の描画

この qWEL 上に、EMT がどのような軌跡を描いてアトラクター遷移を行うかを描画する。まず、GEO から上皮細胞と間葉細胞の遺伝子発現プロファイル例を多数収集して、上皮細胞 (E) と間葉細胞 (M) の遺伝子発現プロファイルの状態空間での頻度分布を形成する。これにボルツマンの公式を適応して、準ポテンシャル分布を計算する。E と M のサンプルデータから形成した準ポテンシャル分布を主成分分析して、第一主成分と第 2 主成分を軸として qWEL を描く。

実験例としては、高橋ら (参考文献) のがんの EMT データをも採用した。高橋らのデータは、網膜色素上皮細胞の培養細胞が TGF- や TNF の添加を受けた時、自動的に EMT を起こす事実を利用したもので、添加後 0, 1, 6, 12, 24, 42, 60 時間の遺伝子発現プロファイルが測定されている。それぞれの時間に 3 サンプル測定されているので、これを使って頻度分布を計算し、ボルツマンの公式に従い、qWEL 上に描画した。

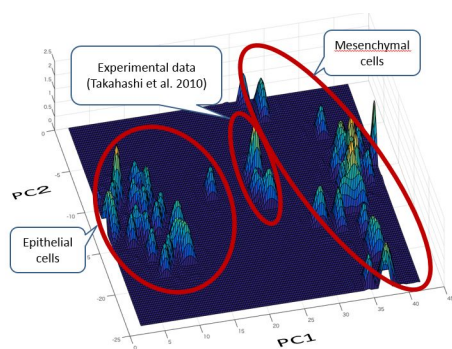
(4) 遺伝子ネットワークの EMT による構造変換

EMT の過程において、細胞内の遺伝子ネットワークがどう構造変換して上皮細胞から間葉細胞に変換するかを、高橋らの EMT 過程における遺伝子発現プロファイルから、遺伝子ネットワークを推定するアルゴリズム ARACNe を適応して、推定した。さらに推定された遺伝子ネットワークの基本構造を抽出するため、Master Regulator 分析を適応して統計的に有意な転写因子を抽出し、縮約した遺伝子ネットワークと MR を抽出し EMT の過程でどのような変化があったか、検討した。

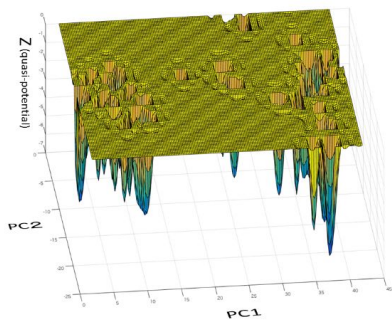
4. 研究成果

(1) 細胞発現状態空間における上皮細胞・間葉細胞の頻度分布と準ポテンシャル分布

図1に、GEO から選んだ上皮細胞、間葉細胞の遺伝子発現プロファイルから描いた状態空間図およびそれをボルツマン変換した準ポテンシャル分布を描く(図1)。EとMの中央にあるのは高橋らの EMT 過程における E と M の分布である。



(a) 頻度分布表示



(b) 準ポテンシャル表示

図1 上皮・間葉細胞の遺伝子発現頻度分布と準ポテンシャル分布

(3) EMT 過程の状態空間への投影

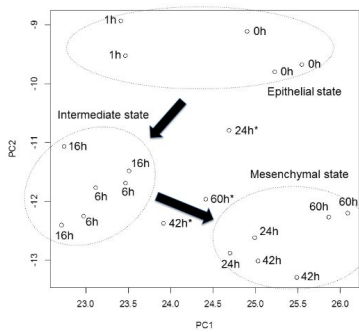


図2 高橋らの EMT データの状態空間への投影

高橋らの EMT 過程において状態がどう変わるか上の状態空間にマップした(図2)。第一主成分と第2主成分を軸にして描画すると、上皮状態(0, 1時間)は直接、間葉状態(24, 42, 64時間)に遷移するのではなく、一旦中間状態

(6, 12時間)に遷移し、それから間葉状態に移ることが明らかになった。

(3) EMT の準ポテンシャル上の軌跡

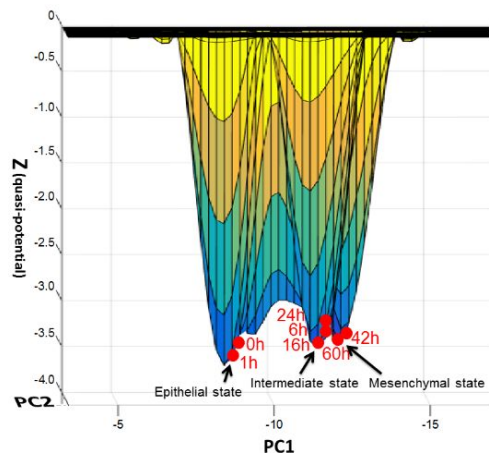


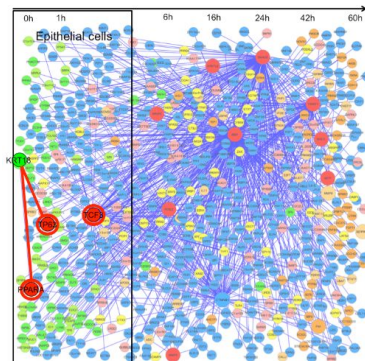
図3 細胞発現状態空間の準ポテンシャル分布における EMT の遷移

この高橋らのデータを準ポテンシャル分布を、導入した qWEL 空間上に描画した。ポテンシャルの窪み(basin)は、図3の左から、上皮状態(E)、中間状態、間葉状態(M)である。中間状態も安定性を表すポテンシャルの窪み(basin)を形成し、安定な状態であることが分かる。すなわち上皮状態は直接、間葉状態に移るのではなく、一旦、中間状態に滞在してから遷移することが明らかになった。

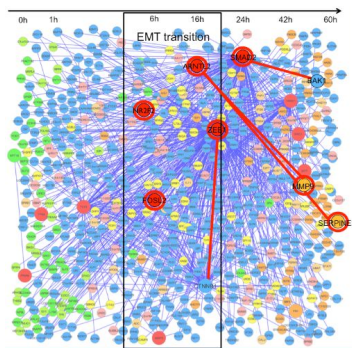
(4) 遺伝子ネットワークの EMT 過程での変化

高橋らの遺伝子発現プロファイルのデータに遺伝子ネットワーク推定のプログラム ARACNe を適応した結果を図4に示す。

(a) 上皮状態の遺伝子ネットワーク



(b) 中間状態の遺伝子ネットワーク



(c) 間葉状態の遺伝子ネットワーク

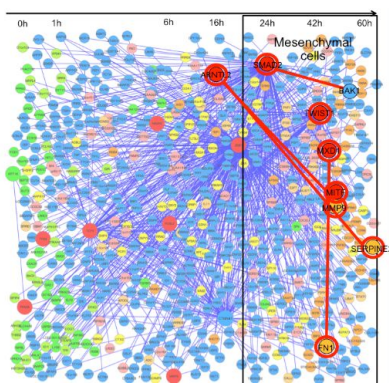


図4 EMTの各状態の遺伝子ネットワーク

これらの各状態の遺伝子ネットワークはmスターレギュレータ(MR)がそれぞれ時期によって異なっており、図示したが上皮状態ではTP63が、中間状態ではZEB1とCTENNB(カテニン)が、間葉状態ではSMAD1がそれぞれの主要なMRになっていることが分かり、遺伝子ネットワークも3状態に分かれることが判明した。

[考察]このEMT過程の3状態説は、国際的にも初めて発見されたものであり、Journal of Molecular Cell Biologyに掲載が決まった(2015年6月号)。この中間状態が何かは、一旦幹細胞状態に戻ってから、間葉細胞に遷移すると思われる。「EMTの3状態説」として今後、さらに詳しい研究を進める予定である。

[文献]

Takahashi, E., Nagano, O., Ishimoto T., et al. (2010). Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. J Biol Chem. 285(6):4060-4073.

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 41 件)

以下の原著英文論文はすべて査読あり

1. Tanaka H, Ogishima S., Network biology approach to cancer EMT: three stage theory, (in press), 2015
2. Arner E., (101 名), Carninci P., Hayashizaki Y. (Tanaka H include) Dynamics of enhancer and promoter activity during mammalian cellular activation and differentiation. Science, (accepted), 2015
3. Eslami A., Miyaguchi K., Mogushi K., Watanabe H., Okada N., Shibuya H., Mizushima H., Miura M., Tanaka H. PARVB overexpression increases cell migration capability and defines high risk for endophytic growth and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer, Doi:10.1038/bjc.2014.590, 2014
4. Katsuta E., Tanaka S., Mogushi K., Matsumura S., Ban D., Ochiai T., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Tanaka H, Tanabe M., Arii S. Age-related clinicopathologic and molecular features of patients receiving curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. The American Journal of Surgery, 208(3):450-456, 2014
5. Watanabe K, Kurihara Y, Watanabe K, Azami T, Nukaya S, Tanaka H. Bio-Signals Sensing by Novel Use of Bi-directional Microphones in a Mobile Phone for Ubiquitous Healthcare Monitoring. IEEE Transactions on Human-Machine Systems, 2014, 44(4):545-550, 2014
6. Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in Poor Virologic Response to Interferon-Based Combination Therapy for Chronic Hepatitis C. PLoS One, 9(5):e97078, 2014
7. Kudo A, Mogushi k, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S. Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. J Gastroenterol, 49(3):502-10, 2014
8. Hase T, Kikuchi K, Ghosh S., Kitano H., Tanaka H. Identification of drug-target modules in the

- human protein–protein interaction network
Artificial Life and Robotics, Volume 19, Issue 4, p406-413, 2014
9. Moriya Y, Uzawa N., Morita T., Kaoru Mogushi K., Miyaguchi K., Takahashi K., Michikawa C., Sumino J., Tanaka H., Harada K., The high-temperature requirement factor A3 (HtrA3) is associated with acquisition of the invasive phenotype in oral squamous cell carcinoma cells
Oral Oncology, 51(84-89), 2014
10. Nukaya S., Sugie M., Kurihara Y., Hiroyasu T., Watanabe K. Tanaka H.
A noninvasive heartbeat, respiration, and body movement monitoring system for neonates .
Artificial Life and Robotics, 19(4):414-419, 2014
11. T Kobayashi, JS Takeuchi, F Ren, K Matsuda, K Sato, Y Kimura, N Misawa, R Yoshikawa, Y Nakano, E Yamada, H Tanaka. VM Hirsch, Y Koyanagi: Characterization of red-capped mangabey tetherin: implication for the co-evolution of primates and their lentiviruses
Scientific Reports 4, 5529, 2014
12. Andersson R, (48 名) Hayashizaki Y, Müller F, The FANTOM Consortium (Tanaka H. incl.), Alistair R. R. Forrest, Carninci P, Rehli M, & Sandelin A.
An atlas of active enhancers across human cell type and tissues.
Nature, 507(7493):455-461, 2014
- 13 Alistair R. (201 名), Piero Carninci & Yoshihide Hayashizaki. (incl. Tanaka H.)
A promoter-level mammalian expression atlas.
Nature, 507(7493):462-470, 2014
- 14 . Kikuchi, M., Ogishima, S., Miyamoto, T., Miyashita, A., Kuwano, R., Nakaya, R., Tanaka, H. Identification of Unstable Network Modules Reveals Disease Modules Associated with the Progression of Alzheimer's Disease.
PLoS ONE, 8(11): e76162. DOI: 10.1371/journal.pone.0076162, 2013
15. Tanaka Y, Nogata H, Tanaka H.
Effect of Music upon Awakening from Nap.
Biomedical Soft Computing and Human Sciences, 18(2):29-37, 2013
16. Tanaka K, Ishihara T, Sugizaki T, Kobayashi D, Yamashita Y, Tahara K, Yamakawa N, Iijima K, Mogushi K, Tanaka H. Sato K, Suzuki H, Mizushima T.
Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease.
Nature Communications, 4:2686, 2013
17. Mogushi K, Tanaka H.
PathAct: a novel method for pathway analysis using gene expression profiles.
Bioinformatics, 9(8): 394-400, 2013
18. Ogishima S, Mizuno S, Kikuchi M, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H. Nakaya J.
A Map of Alzheimer's Disease-Signaling Pathways: A Hope for Drug Target Discovery.
Clinical Pharmacology & Therapeutics, 93(5):399-401, 2013
19. Muramatsu S., Tanaka S., Mogushi K., Adikrisna R., Aihara A., Ban D., Ochiai T., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Nakayama K., Tanaka H., Yamaoka S., Arii S.
Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication.
Hepatology, 58(1):218-28, 2013
20. Takahashi M., Obayashi M., Ishiguro T., Sato N., Niimi Y., Ozaki K., Mogushi K., Mahmut Y., Tanaka H., Tsuruta F., Dolmetsch R., Yamada M., Takahashi H., Kato T., Mori O., Eishi Y., Mizusawa H., Ishikawa K.
Cytoplasmic Location of alpha1A Voltage-Gated Calcium Channel C-Terminal Fragment (Cav2.1-CTF) Aggregate Is Sufficient to Cause Cell Death.
PLoS One, 8(3):e50121, 2013
21. Rotkrue P., Shimada S., Mogushi K., Akiyama Y., Tanaka H., Yuasa Y.
Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model.
British Journal of Cancer, 108(4):932-40, 2013
22. Sato K., Tanaka S., Mitsunori Y., Mogushi K., Yasen M., Aihara A., Ban D., Ochiai T., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Tanaka H., Arii S.
Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance.
Hepatology, 57(4):1436-47, 2013
23. Mayinuer A., Yasen M., Mogushi K., Obulhasim G., Xieraili M., Aihara A., Tanaka S., Mizushima H., Tanaka H., Arii S.
Upregulation of Protein Tyrosine Phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) Associated with tumor differentiation and a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma.
Annals of Surgical Oncology, 20:305-17, 2013
24. Sumino J., Uzawa N., Okada N., Miyaguchi K., Mogushi K., Takahashi KI., Sato H., Michikawa C., Nakata Y., Tanaka H., Amagasa T.
Gene expression changes in initiation and progression of oral squamous cell carcinomas revealed by laser microdissection and oligonucleotide microarray analysis.
International Journal of Cancer, 132(3):540-8, 2013
25. Kikuchi A., Ishikawa T., Mogushi K., Ishiguro M., Iida S., Mizushima H., Uetake H., Tanaka H., Sugihara K.
Identification of NUCKS1 as a colorectal cancer prognostic marker through integrated expression and copy number analysis.
International Journal of Cancer,

- 132(10):2295-302, 2013
26. Obulhasim G., Yasen M., Kajino K., Mogushi K., Tanaka S., Mizushima H., Tanaka H., Arii S., Hino O.
Up-regulation of dbpA mRNA in hepatocellular carcinoma associated with metabolic syndrome. *Hepatology International*, 7:215-25, 2013
27. Kudo A., Mogushi K., Takayama T., Matsumura S., Ban D., Irie T., Ochiai T., Nakamura N., Tanaka H., Anzai N., Sakamoto M., Tanaka S., Arii S.
Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study.
Journal of Gastroenterology, Doi: 10.1007/s00535-013-0791-4 2013
28. Mizuno S., Iijima R., Ogishima S., Kikuchi M., Matsuoka Y., Ghosh S., Miyamoto T., Miyashita A., Kuwano R., Tanaka H.
AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer's disease.
BMC Systems Biology, 6:52, 2012
29. Katayama Y., Maeda M., Miyaguchi K., Nemoto S., Yasen M., Tanaka S., Mizushima H., Fukuoka Y., Arii S., Tanaka H.
Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling.
Oncology letter, 4(4):817-23, 2012 (IF:0.108)
30. 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.
Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell.
Nature Communications, 6(3):883, 2012
31. Khamas A., Ishikawa T., Mogushi K., Iida S., Ishiguro M., Tanaka H., Uetake H., Sugihara K.
Genome-wide screening for methylation-silenced genes in colorectal cancer.
International Journal of Oncology, 41(2):490-6, 2012
32. Xieraili M., Yasen M., Mogushi K., Obulhasim G., Mayinuer A., Aihara A., Tanaka S., Mizushima H., Tanaka H., Arii S.
Villin 1 is a predictive factor for the recurrence of high serum alpha-fetoprotein-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy.
Cancer Science, 103(8):1493-501, 2012
33. Khamas A., Ishikawa T., Shimokawa K., Mogushi K., Iida S., Ishiguro M., Mizushima H., Tanaka H., Uetake H., Sugihara K.
Screening for epigenetically masked genes in colorectal cancer Using 5-Aza-2'-deoxycytidine, microarray and gene expression profile.
Cancer Genomics & Proteomics, 9(2):67-75, 2012
34. Suzuki S., Takai-Igarashi T., Fukuoka Y., Wall D.P., Tanaka H., Tonellato P.J.
Systems analysis of inflammatory bowel disease based on comprehensive gene information.
BMC Medical Genetics, Apr 5; 13:25, 2012
35. Boeck M., Ogishima S., Tanaka H., Kramer S., Kaderali L.
Hub-centered gene network reconstruction using automatic relevance determination.
PLoS ONE, 7(5):e35077, 2012
36. Miyaguchi K., Uzawa N., Mogushi K., Takahashi K.I., Michikawa C., Nakata Y., Sumino J., Okada N., Mizushima H., Fukuoka Y., Tanaka H.
Loss of NKX3-1 as potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.
International Journal of Oncology, 40(6):1907-14, 2012
37. Shimada S., Mimata A., Sekine M., Mogushi K., Akiyama Y., Fukamachi H., Jonkers J., Tanaka H., Eishi Y., Yuasa Y.
Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer.
Gut, 61(3):344-53, 2012
38. Okazaki S., Ishikawa T., Iida S., Ishiguro M., Kobayashi H., Higuchi T., Enomoto M., Mogushi K., Mizushima H., Tanaka H., Uetake H., Sugihara K.
Clinical significance of UNC5B expression in colorectal cancer.
International Journal of Oncology, 40(1):209-16, 2012
39. Yasen M., Obulhasim G., Kajino K., Mogushi K., Mizushima H., Tanaka S., Tanaka H., Hino O., Arii S.
DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue.
International Journal of Oncology, 40(3):789-97, 2012
40. Nukaya S., Shino T., Kurihara Y., Watanabe K., Tanaka H.
Noninvasive Bed Sensing of Human Biosignals via Piezoceramic Devices Sandwiched Between the Floor and Bed.
IEEE Sensors Journal, 12(3):431-38, 2012
- 〔図書〕(計1件)「疾患システムバイオロジー」(培風館、2012)
〔産業財産権〕
出願状況 なし
取得状況 なし
〔その他〕なし
6. 研究組織
研究代表者のみ
田中博 東京医科歯科大学難治疾患研究所
(教授)
研究者番号：60155158