

平成27年度福島医薬品関連産業支援拠点化事業の実績報告書
【概要版（HP掲載用）】

平成28年10月

公立大学法人福島県立医科大学 ふくしま国際医療科学センター内

医療 - 産業トランスレーショナルリサーチセンター

● 補助対象事業の結果

バイオマーカーの開発など、がん治療等に有効な医薬品を創出するための創薬研究を行うとともに、医療界と産業界を円滑に橋渡しをすることにより、がんを中心とした諸疾患の新規治療薬・診断薬・検査試薬や医療機器などの開発支援を多面的に行うための拠点を形成することを目的として、医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター（医療-産業TRセンター）の整備を行った。

○ 拠点整備(拠点整備に係る研究備品設置事業)および拠点運営

1 医薬品関連産業支援拠点化整備・運営事業

研究者の確保や機器等の整備(様式第 13 取得財産等管理台帳兼取得財産等明細表のとおり)など研究体制の充実を図り、次の研究活動に取り組んだ。また、企業との118件のコーディネート業務を行い、(10)の成果につなげた。

(1) 各種ヒト由来検体の取得と遺伝子発現プロファイルの体系的取得・解析

福島県立医科大学附属病院、学外関連病院または共同研究機関等から各種ヒト検体（手術摘出組織、生検組織、末梢血、項目（8）において *in vitro* または *in vivo* で増殖させた組織・細胞等を含む）を採取・活用するための臨床研究基盤および取得方法を確認し（CD1、CT1）、1,460 件の臨床検体および付随する臨床情報を取得した（CD2、CT2）。

また、前記の臨床検体に加え、海外から入手可能なヒト由来検体、各種培養細胞、および市販の RNA サンプル、各種細胞（がん細胞株、正常細胞、遺伝子導入細胞、各種化合物を添加した細胞等を含む）、担がん動物由来がん組織及び購入した組織等の中から厳選した 2,200 サンプルの遺伝子発現プロファイルを取得した（項目（1）、（4）及び（9）で取得したものを含む）（GE1、CD3）。さらに、それら生体試料に付随する疾患名の統一作業を行い、6,600 件についてコード化を行った（CT3）。

これまでに取得したがん組織または正常組織の遺伝子発現プロファイルの解析（GE2）から、各種がん（乳がん、食道がん、卵巣がん等）の組織型分類マーカー遺伝子や診断マーカー遺伝子等を特定し、さらにそこから遺伝子を絞り込み、実用化へ向けて検査・診断薬企業と共同研究を始めている（GE3、IN1）。また、特定の抗がん剤の効果を予測できるバイオマーカー（遺伝子）の開発を進めた（GE4、IN2）。

がん化に関係する各種 EGFR、TP53 または BRAF 変異体 cDNA を導入した細胞株の遺伝子発現プロファイルを取得（GE5）し、各

種抗がん剤の感受性や EGF 非依存的な増殖能の獲得と相関する遺伝子発現変動パターンを明らかにした (GE 6、IN 3)。

食道類基底細胞癌の診断マーカーを開発し、特許出願を行った (GE 7、IN 4)。

血液を用いた網羅的遺伝子発現解析により、重症敗血症患者のバイオマーカー探索を行った (GE 8、IN 5)。

(2) cDNA リソースの新規取得と各種活用型への変換

ヒト遺伝子 6,361 遺伝子について、COSMIC データベースを用いて変異情報を追加し、より正確な遺伝子セットを構築した (TA 1)。それらの遺伝子から厳選した遺伝子について、その変異型として 255 種のエントリークローンを取得した (TA 2)。また、未取得正常遺伝子 1,744 種のエントリークローンを取得した (TA 3)。これらの総合計 1,999 遺伝子のエントリークローンは全塩基配列を決定した (TA 4)。取得した cDNA クローンをレトロウイルスベクター発現クローンとして 1,059 種作製 (TA 5) し、遺伝子機能解析のために活用した。

また、不死化細胞について 12 種を新たに作製した (TA 6)。

さらに、上記の疾患関連遺伝子およびその変異遺伝子、細胞初期化遺伝子等のレトロウイルスベクター発現クローンを各種細胞へ導入し、新規生体材料を作製した (TA 7)。

(3) 新規疾患関連遺伝子の探索と機能解析

発がん、浸潤・転移を制御する機能を個々の遺伝子について評価するための「多検体・個別遺伝子評価系」の開発において、NIH3T3 細胞を用いた 96 ウェルプレートフォーマットのフォーカス形成アッセイと軟寒天コロニー形成アッセイ系 (GF 1) を用いて 802 個の癌関連候補遺伝子の個別評価を行い (GF 2)、4 個のがん遺伝子候補を同定した。また、MCF10A 細胞等のがんで検出されるがん関連遺伝子 (ALK, FLT3, DNMT3A, IDH1, IDH2, AKT1, GNAQ, GNA11, KIT1, KIT2, JAK2) の変異体を導入した計 204 細胞株を樹立 (GF 3) し、増殖因子依存性、ウェスタンブロットによるリン酸化シグナル伝達経路の解析、薬剤感受性試験および遺伝子発現プロファイリングの取得を進めた (GF 4)。

乳癌で予測された 33 カ所の遺伝子増幅部位に存在する 845 遺伝子から造腫瘍能を有する受容体遺伝子を一つ (累計 4 個) 同定した (GF 5)。

がん幹細胞などの特定の細胞の同定や細胞の分化・機能変化のイメージング、薬剤感受性試験、疾患マーカー・疾患関連遺伝子の探索を目的として遺伝子トラップ用のベクターの開発を進め、モデル薬物や任意の遺伝子に応答するレポーター細胞を作製した (GF 6)。そし

て Forskolin に応答する遺伝子部位の候補として 2 個、Thapsigargin に応答する遺伝子部位の候補として 6 個、癌関連遺伝子である c-MYC、および HNF1B の発現に応答する遺伝子部位の候補としてそれぞれ 2 個、および 10 個を同定した。また、遺伝子トラップを利用してタンパク質どうしの結合を指標に遺伝子機能を評価する系を構築した (GF 7)。これを用いて NF κ B の構成因子である p65 に結合する因子の候補として 14 個同定した (GF 8)。

(4) 各種の刺激を加えた培養細胞の体系的遺伝子発現プロファイルの取得・解析

心筋細胞に対する薬物の遺伝子発現に与える影響を評価した。ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞について、安定した心筋の拍動を確認後、抗がん剤を中心に 33 種類の化合物を処理し、100 サンプルの遺伝子発現プロファイルを取得した (CB 1)。その結果、ヒト心筋細胞で、薬物に対する遺伝子発現に変化があることが判明した。更なる解析により、重篤な心毒性作用である催不整脈を引き起こす薬物に特徴的な遺伝子発現変化を示す 19 遺伝子を同定した (CB 2、GE 9、IN 6)。これら遺伝子変化を指標に薬物の催不整脈作用を評価する系を確立した (CB 3、GE 10、IN 7)。加えて、心筋の器質障害を示す化合物の評価も行い、器質障害によると特徴的な遺伝子変化を検出することに成功した。

血管内皮細胞に対する薬物や生理活性物質の遺伝子発現に与える影響を評価した (CB 4、GE 11、IN 8)。ヒト臍帯静脈内皮細胞と各種ヒト血管内皮細胞に、44 種類の化合物や生理活性物質を処理し、109 サンプルの遺伝子発現プロファイルを取得した (GE 12)。その結果、化合物や生理活性物質により特徴的な遺伝子発現変化が起こることを確認した。

(5) 化学物質に対する基盤的培養細胞応答情報の体系的取得・解析

種々の薬物に対するヒトがん細胞の応答情報の体系的取得・解析を行うために、子宮がん細胞 6 株、血液がん細胞 2 株、卵巣がん細胞 2 株、肺がん細胞 21 株および大腸がん細胞 1 株に対して、抗がん剤を中心に 134 種類の化合物の感受性試験を行った (CB 5)。その結果、5,618 のデータを取得し、クラスタ解析により化合物と細胞株の分類を行い、これらのデータのデータベース化を進めた (CB 6)。さらに、臨床リソース・データ基盤分野より樹立した臨床由来のがん細胞 4 株についても同様の解析 (化合物 146 種類、490 データ) を行い、がん細胞株のデータと比較解析を行った (CB 7)。

トランスクリプトーム解析分野および、遺伝子機能解析分野で作製したがん関連遺伝子の変異体発現細胞 95 株を用いて、144 種類の抗がん剤の感受性試験を行った (CB 8)。これまでに、13,680 のデータを取得し、感受性パターンの解析を行った結果、特定の遺伝子変異と抗がん剤の感受性との関連性を明らかにした (CB 9)。

(6) 生体材料の基盤的タンパク質発現情報の体系的取得・解析

平成 26 年度に引き続き、新たなプロテオーム解析技術である「逆相タンパク質マイクロアレイ法 (RPPMA)」の開発に取り組んだ (P A 1)。本法は、1 枚のスライドガラスに数万検体由来のタンパク質サンプルを載せることにより、検体間のタンパク質の発現レベルを網羅的に横並びに比較できる画期的なシステムである。システムの開発と同時に RPPMA 用のタンパク質サンプル調製法を確立し、約 1,013 検体以上のサンプル調製を行った (P A 2)。次いで、予備実験を含み RPPMA を 702 解析以上行った (P A 3)。RPPMA により注目されたタンパク質について、2次元電気泳動-ウェスタンブロット法 (2D-WB) および質量分析法 (MS) 等で翻訳後修飾 (リン酸化) 等の詳細解析を 106 解析以上行った (P A 4)。昨年度に引き続き、遺伝子発現解析用ライセートからタンパク質抽出を行い、2,010 検体以上を処理した (P A 5)。

(7) 生体材料の基盤的ゲノム配列情報の体系的取得・解析

ゲノム DNA の塩基配列を解析できるヒト由来サンプルの収集として、臨床検体由来サンプル 2,167 検体から DNA を抽出した (G A 1)。その中には、ゲノム配列解析の同意を得ている福島医大附属病院からの FMU#検体が 1,102 検体含まれている。次いで、がんおよび他の諸疾患患者における遺伝子塩基配列の変化を探索するとともにその検出方法の開発としては、① Whole Exome Sequence (WES) 法の AmpliSeq Exome (ASE) 法 (Ion Ampliseq Human Exome kit) での配列解析、② 疾患遺伝子解析パネル法の CHP 50 遺伝子パネル (Cancer Hotspot Panel v2)、CLP 22 遺伝子パネル (Colon and Lung Cancer Panel)、AML 19 遺伝子パネルと CCP 409 遺伝子パネル (Comprehensive Cancer Panel) での配列解析、③ Whole Genome Sequence (WGS) 法での配列解析、および、④ FLT3 遺伝子の PCR 法 (FLT3/ITD Mutation Detection Set) での解析を行い、変異と CNV (Copy number variation) の検出・解析を行った (G A 2)。WES ASE 404 件、CHP 723 件、CLP 258 件、CCP 44 件、WGS 5 件のゲノム配列解析とその情報解析および PCR 法による FLT3 遺伝子変異解析 40 件の合計 1,474 件の解析を行った (G A 3)。特に、FMU#検体については、DNA グレード、がん情報等の評価のために CHP と CLP での解析を、ASE 解析の前解析として積極的に行った (G A 4)。また、できる限り原発腫瘍組織部位と隣接正常組織等のコントロール部位とのペアでの比較解析による変異解析に重点をおいた解析を行った (G A 5)。実験手法や情報解析法についての改良も、データを取得しながら積極的に行った (G A 6)。

(8) 各種生体材料の活用型への変換

福島県立医科大学附属病院等からのがん組織 (臨床検体) を免疫不全マウス (NOG) に移植・継代後、腫瘍を摘出して凍結保存、病理組織

学的解析用および網羅的遺伝子発現解析用の検体作製を行った（AE 1）。2015年4月から2016年3月までに162件の臨床検体（婦人科がん、整形外科領域がん等の固形がん112件、白血病等の血液疾患で50件）を取り扱い、557匹の担がんマウスを作製した（AE 2）。白血病モデルマウスの作製を進め、これまでにB前駆細胞性急性リンパ性白血病（BCP-ALL）6件、T細胞性急性リンパ性白血病（T-ALL）1件および悪性Tリンパ腫（T-LBL）1件について継代・凍結保存が可能であることを確認した。また、BCP-ALL3件、T-ALL1件、T-LBL1件については、多数のNOGマウスに同時移植し、生着率や病態の進行過程を観察した結果、個体差も少なく良好な成績を得ることができた。BCP-ALL1件およびT-ALL1件で、モデルマウスを使用した抗がん剤薬効評価試験の有用性が高いことを確認した（AE 3）。

さらに、がん組織を培養細胞系へ移行させる加工技術の開発を目指し、臨床サンプル及び担がん動物由来のがん組織を用いた227件の各種培養実験（培地開発、遺伝子導入を含む）を行い、活用可能な新規がん細胞培養系として8件確立した（CD 4）。

（9）各種薬剤の毒性試験及びそれに伴う臓器・組織の遺伝子発現プロファイルの取得・解析

ラットを用いた化学物質の生体応答評価の集積をめざし、薬物（サリドマイド4,000 mg/kg、レナリドミド1,000 mg/kg、塩酸イミプラミン125 mg/kg、イブプロフェンナトリウム200 mg/kg、塩酸メトホルミン1,500 mg/kg、アスピリン500 mg/kg、セレコキシブ2,000 mg/kg、アセトアミノフェン1,500 mg/kg、イベルメクチン10 mg/kg、シクロスポリンA 100 mg/kg、フェノフィブラート500 mg/kg、シメチジン1,500 mg/kg、クエン酸タモキシフェン100 mg/kg およびリファンピシン250 mg/kg: 計14薬物）を対象として試験を行った。被験薬をラットに7日間反復経口投与し、テレメトリー法による投与期間中の生理学的解析、諸臓器の遺伝子発現プロファイル取得や病理組織学的解析を行った（AE 4、GE 13）。

サリドマイド誘導体であるサリドマイドとレナリドミドでは発現の増減する遺伝子が異なることが明らかになった（AE 5、GE 14）。また、投与に伴う体温変化が薬物によって異なり、テレメトリー法による体温モニタリングが毒性評価指標として有用であることが示唆された。

以上の試験で、オスのSDラット169匹を使用した（AE 6）。

（10）共同研究等

製薬企業との共同研究を3件（CB 10、PA 6、GE 15、IN 9）、成果情報提供契約を8件、秘密保持契約を4件締結し、研究を進めている。また、検査・診断薬企業と特許共同出願契約を2件締結し、2つの特許出願が完了している（IN 10、GE 16）。

○ 拠点整備（拠点整備に係る施設建築事業）

2 医薬品関連産業支援拠点駐車場整備事業

医大に整備予定の医療 - 産業 T R センターの駐車場の工事を行った。

3 医薬品関連産業支援拠点施設整備事業

医大に整備予定の医療 - 産業 T R センターの建設工事を行った。

4 医薬品関連産業支援拠点高圧受電設備整備事業

医大に整備予定の医療 - 産業 T R センターの高圧受電設備の工事を行った。