

平成26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27年6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に図り、次の研究活動に取り組んだ。また、企業との95件のコーディネート業務を行い、(10)の成果につなげた。

さらに、報告会を2回開催し、参画企業や県内外の医薬品等関連企業などへ事業の周知を図り意見交換を行なうとともに、関連情報の収集を行った。

(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立し、1,633件の臨床検体および付随する臨床情報を取得した。

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2,180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）。さらに、それら生体試料に付随する疾患名の統一化作業を行い、2,180件についてコード化を行った。

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を同定した。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）を開発中である。

がん化に関係する各種EGFRまたはTP53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。

腎がんの悪性度を予測する遺伝子マーカーおよび髄膜腫の浸潤性・非浸潤性を診断する遺伝子マーカーについて、特許出願を行った（計2件）。

(2) cDNA リソースの新規取得と各種活用型への変換

疾患関連遺伝子のうち 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。疾患関連遺伝子を正常型として 340 種、変異型として 90 種の合計 430 種のエントリークローンを取得した。また、未取得正常遺伝子 1,527 種のエントリークローンを取得した。これらの総合計 1,957 遺伝子のエントリークローンは全塩基配列を決定した。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 1,361 種作製し、遺伝子機能解析のために活用した。

また、初代培養細胞について不死化細胞作製の培養条件を決定し、2 種の初代培養細胞に対して不死化因子を導入し、15 種的不死化細胞を作製した。

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。

(3) 新規疾患関連遺伝子の探索と機能解析

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、レポーター細胞の作成技術の開発に取り組んだ。今年度は、レポーターアッセイ系を構築するために、ランダムプロモーターラップベクターおよびその手法を開発した。

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」の開発に取り組み、前年度までに開発した NIH3T3 細胞を用いた 96 ウェルプレートでのフォーカス形成アッセイに加え、軟寒天コロニー形成アッセイ系を確立した。これらの系を用いて 916 個の癌関連候補遺伝子の個別評価を行った。また、MCF10A 細胞にがん検出されるがん遺伝子 (RAS など) ・がん抑制遺伝子 (TP53) の変異体、転写因子及び代謝系酵素遺伝子を導入した計 219 細胞株を樹立し、薬剤感受性や遺伝子発現プロファイリングをチーム間連携で進めるとともに、増殖アッセイ、遊走能・浸潤能アッセイ、三次元培養アッセイを実施して遺伝子機能を評価し、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 遺伝子について、NMuMG 細胞を評価用細胞として用いたフォーカスアッセイならびに造腫瘍アッセイにより TBX2 を 17q23 の遺伝子増幅領域におけるがん遺伝子として同定した。三次元培養系を用いて、TOB1 などの遺伝子にがん化の初期に関わると考えられるスフィア形成阻害活性を見いだした。

in vitro での浸潤能や in vivo での転移能を指標として、高浸潤能、転移能を有する細胞の樹立を進めた。

(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。初代培養のラット心筋細胞とヒト 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、循環器薬を中心に 69 種類の化合物を処理し、290 サンプル (ヒト 230 サンプル、ラット 60 サンプル) の遺伝子発現プロファイルを取得した。その結果、ラットおよび、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見出すことができた。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。今後、特許出願を行う予定である。

血管内皮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。ヒト臍帯静脈内皮細胞とヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の培養条件を検討した。これらの細胞について、循環器薬を中心に 36 種類の化合物を処理し、54 サンプルの遺伝子発現プロファイルを取得した。その結果、化合物により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、乳がん細胞 2 株、血液がん細胞 6 株、前立腺がん細胞 3 株、卵巣がん細胞 13 株、肺がん細胞 1 株および胃がん細胞 1 株に対して、抗がん剤を中心に 143 種類の化合物の感受性試験を行った。その結果、3,718 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。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 3 株についても同様の解析（化合物 91 種類、286 データ）を行ったところ、がん細胞株に比べて抗がん剤に高い耐性を示すことを明らかにした。

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 50 株を用いて、116 種類の抗がん剤の感受性試験を行った。これまでに、6,960 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。

電気抵抗値で拍動を観察することで心毒性を評価した。ラット心筋細胞とヒト心筋細胞を用いて循環器薬を中心に 52 種類の化合物を 2~5 濃度で処理し、495 のデータ（ヒト 175、ラット 320）を取得し、化合物の拍動への影響を分類した。その結果、化合物の拍動への影響と遺伝子発現プロファイルの変化に相関性があることを見出した。

(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

本年度から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。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 1,000 検体のサンプル調製を行った。次いで、予備実験を含み RPPMA を約 700 解析を行った。RPPMA により注目されたタンパク質は、7 検体について 2 次元電気泳動-ウェスタンブロット法 (2D-WB) で翻訳後修飾 (リン酸化) の詳細を解析した。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、約 1,600 検体を処理した。

(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 1,505 検体から DNA を抽出した。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 522 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、Whole Exome Sequence (WES)法の AmpliSeq Exome (ASE)法 (Ion Ampliseq Human Exome kit; 約 294,000 amplicons; 約 58Mb)、疾患遺伝子解析パネル法の CHP 50 遺伝子パネル (Cancer Hotspot Panel v2; 207 amplicons)、CLP 22 遺伝子パネル (Colon and Lung Cancer Panel; 90 amplicons) と CCP 409 遺伝子パネル (Comprehensive Cancer Panel; 15,992 amplicons、および Whole Genome Sequence (WGS)法での配列解析を行い、変異と CNV (Copy number variation) の検出・解析を行った。WES ASE 469 サンプル、CHP 609 サンプル、CLP 164 サンプル、CCP 34 サンプル、WGS 7 サンプルのゲノム配列解析とその情報解析を行った。WGS 7 サンプルのうちの 1 サンプルについては、Mate-pair ライブラリー作成法での解析も行った。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。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。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。さらに、FFPE からのゲノム DNA 抽出技術の開発・配列解析については、CHP では、ほとんどのサンプルで解析可能で、質の良いサンプルなら ASE 法での解析まで可能なところまで改良した。以上の解析を通して技術基盤の確立と今後の一層の体系的解析へ向けての基盤構築を行った。

(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で摘出したがん組織 (臨床検体) を免疫不全マウス (NOG マウス) に移植し、継代後、腫瘍を摘出してセルバンカーによる腫瘍組織の凍結保存、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。2014 年 4 月から 2015 年 3 月までに 111 件の臨床検体 (乳がん、婦人科がん、整形外科領域がん等の固形がん 93 件、白血病等の血液疾患で 18 件) を取り扱い、379 匹の担がんマウスを作製した。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) 3 件、T 細胞性急性リンパ性白血病 1 件および悪性 T リンパ腫 1 件について継代かつ凍結保存が可能な株とすることができた。また、BCP-ALL 1 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、移植した NOG マウスすべてで同時期に生着し、その後の経過所見でも個体差が少なく、安定している株であることが明らかとなった。当該 BCP-ALL モデルマウスを使用した抗がん剤薬効評価試験を行い、抗がん剤の薬効評価への有用性が高いことを確認した。

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 133 件の各種培養実験 (培地開発、遺伝子導入を含む) を行い、新規培養細胞系統として 32 件確立した。

(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作用評価の集積をめざし、市場撤退薬を対象として試験を行った。心毒性が原因で市場撤退したテルフェナジン (1,000 mg/kg) を SD ラットに 7 日間反復経口投与し、心電図や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。テルフェナジン投与群において、洞性徐脈、体温・自発活動量の低下、心臓や大動脈における明瞭

な遺伝子発現変動等を確認した。併せて、上記試験手法は、「短期投与複合型安全性試験」として有用性が高いことが示唆された。

この方式により、高血圧自然発症ラット（SHR）を用いたカルシウム拮抗薬（アムロジピン）の7日間反復経口投与試験や、SD、WKY および SHR における網羅的遺伝子発現解析および生理学的パラメータの背景データ取得試験等を実施した（A E 6）。さらに、ストレプトゾトシンを用いた1型糖尿病モデルの諸臓器における網羅的遺伝子発現解析を行った。以上の試験で、オスのSDラット94匹、オスの高血圧自然発症ラット（SHR/Izm）44匹およびその対照ラット（WKY/Izm）20匹を使用した。

(10) 共同研究等

製薬企業との共同研究を3件、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。

○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TRセンターの駐車場の工事に着工した。

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TRセンターの建設工事に着工した。

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TRセンターの高圧受電設備の工事に着工した。