

The 23rd Lung Cancer Workshop

網羅的発現解析による肺癌の分子病態理解と 新規治療標的分子の探索

醍醐弥太郎¹・中村祐輔¹

Understanding of Molecular Aspects of Lung Carcinogenesis and New Therapeutic Target Discovery Based on Comprehensive Gene and Protein-expression Profiles

Yataro Daigo¹; Yusuke Nakamura¹

¹Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan.

ABSTRACT — Progress in omics science including genomics and proteomics has enabled us to obtain comprehensive gene- and protein-expression profiles of cancers. We performed gene expression profile analysis of 101 archived lung cancers using an originally developed cDNA microarray system. Through a subsequent systematic approach using a tissue microarray containing 900 archived lung cancers, coupled with siRNA experiments, and high throughput enzyme-linked immunosorbent assay techniques covering serum samples from 500 lung cancer patients, as well as serum glycoproteomics that allows the high-throughput recognition of cancer-associated aberrant glycosylations, we have identified a set of oncoantigens and elucidated new cancer pathways that can be regarded as potential targets for the development of cancer biomarkers as well as being useful in the development of small molecule drugs, antibody drugs, peptide/siRNA-based drugs, and cancer vaccines. We here describe our effort to clarify the molecular mechanisms of lung carcinogenesis and to develop new diagnostic and therapeutic techniques based on genome-wide gene/protein expression profiles.

(JLCC. 2009;49:917-927)

KEY WORDS — Lung cancer, Omics, Therapeutic target, Biomarkers, Personalized medicine

Reprints: Yataro Daigo, Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

要旨 — ゲノミクス・プロテオミクスに代表されるオミックス研究の進展により、ゲノムワイドな遺伝子やタンパク質の発現レベルの変化に基づき発癌機構の全体像をより網羅的に把握することが可能となっている。我々は独自に構築したcDNAマイクロアレイシステムを用いて肺癌101症例の遺伝子発現プロファイル解析を行い、さらに肺癌900症例を網羅する組織マイクロアレイシステム、siRNAによる癌細胞での遺伝子発現阻害実験、500症例の肺癌患者血清を迅速解析する血清ELISAおよび血清タンパク質上の癌特異的な糖鎖構造変化を網

羅的に同定する質量分析システムを併用して、肺癌において癌特異的に発現する oncoantigen を複数同定し、その発癌に関わる未知分子経路を解明してきた。さらにこれらを標的とした新規バイオマーカーと低分子薬、抗体医薬、核酸・ペプチド医薬や癌ワクチンの開発を進めている。ゲノムワイドな遺伝子・タンパク質の発現情報に基づいた肺癌の分子病態理解と新規の診断・治療法の開発に向けた取り組みを概説する。

索引用語 — 肺癌, オミックス, 分子標的, バイオマーカー, 個別化医療

¹東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・ゲノムシーケンス解析分野。

別刷請求先：醍醐弥太郎，東京大学医科学研究所ヒトゲノム解

析センター・ゲノムシーケンス解析分野，〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1。

はじめに

近年の画像診断技術や分子標的治療薬をはじめとする新薬の導入にも関わらず、肺癌の多くは早期診断と根治が困難であり、画期的な診断・治療法の開発による肺癌制圧は急務となっている。我々の研究室では、癌の個別化（オーダーメイド）医療の臨床展開に貢献することを目的に、ゲノム・プロテオーム解析技術を用いた各種癌組織・細胞と血液試料の網羅的遺伝子・タンパク質発現情報解析、タンパク質修飾解析（リン酸化、メチル化、グリコシル化、他）、体細胞遺伝子変異解析、一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）解析を進めて、体系的な癌の分子病態の解明を進めている。肺癌における主な研究領域は、(1) 癌細胞で特異的に活性化され、癌遺伝子機能を有する癌抗原（oncoantigen）を介した細胞増殖・不死化・接着・転移に関わる未知シグナル伝達経路とゲノム動態制御機構の解明、(2) これらを分子標的とした治療薬（低分子薬、抗体医薬、ペプチド・核酸医薬）や癌ワクチンの開発、(3) 癌の未病状態と早期癌の検出、病態診断（予後、転移、抗癌剤・放射線感受性予測）に有用な血清・組織バイオマーカーの同定と生存期間の延長に寄与しうる統合的な癌分子病態診断システムの構築、(4) 癌発症に関わる遺伝子異常（エピジェネティック変化、体細胞変化、SNP）の同定による癌予防法の開発からなる（Figure 1）。本稿では、網羅的発現解析による癌の分子病態理解とその臨床応用の試みを概説する。

(1) 網羅的発現情報を用いた肺癌の治療標的分子の探索戦略

我々は肺癌の発生と悪性化に深く関与し、バイオマーカーや分子標的治療薬・癌ワクチンの開発に有用な標的分子を同定するために以下に示す探索戦略をとっている（Figure 2）。すなわち、(1) レーザーマイクロダイセクション法で癌細胞部分を選択的に採取された101症例の肺癌組織と正常30臓器のゲノムワイドの遺伝子発現情報、(2) 肺癌900症例を同時に解析可能な組織マイクロアレイシステム、(3) 肺癌患者血清500症例以上を備えた迅速血清enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）システムを用いて、多様な病態を示す肺癌における癌関連分子の発現情報を取得している。さらに、(4) siRNAや抗体による癌細胞での機能阻害実験や正常細胞への遺伝子導入実験により、癌細胞の増殖・浸潤に関与すると考えられた遺伝子について、創薬スクリーニング系の構築を念頭にその主要分子経路の機能解析を進めている。(5) またマイクロアレイ情報と臨床情報をバイオインフォマティクス解析することで、肺癌の抗癌剤感受性やリンパ節・遠隔臓器転移に関わる遺伝子群の同定を試みている。一方、(6) 質量分析計を用いて肺癌患者と健常者の血清タンパク質量やその糖鎖修飾レベルを比較解析して得られたプロテオーム・グライコーム情報をマイクロアレイデータと統合し、糖鎖修飾を標的とした血清バイオマーカーの開発を進めている（Figure 3）。¹⁻³⁰ これらの諸段階を経て同定された候補標的分子の多くは

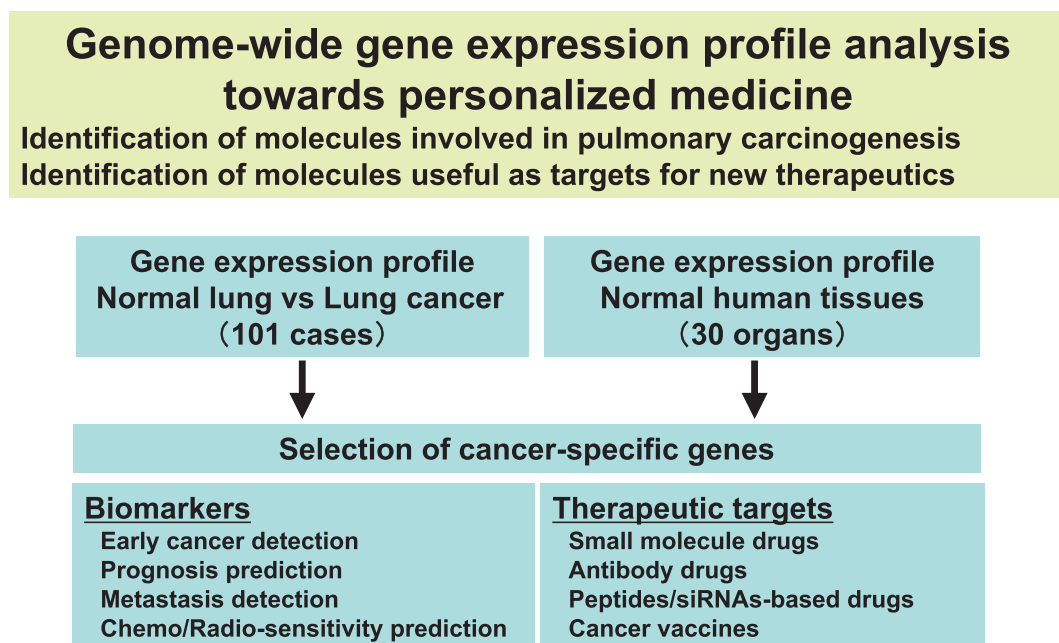


Figure 1. Genome-wide gene expression profile analysis towards personalized medicine.

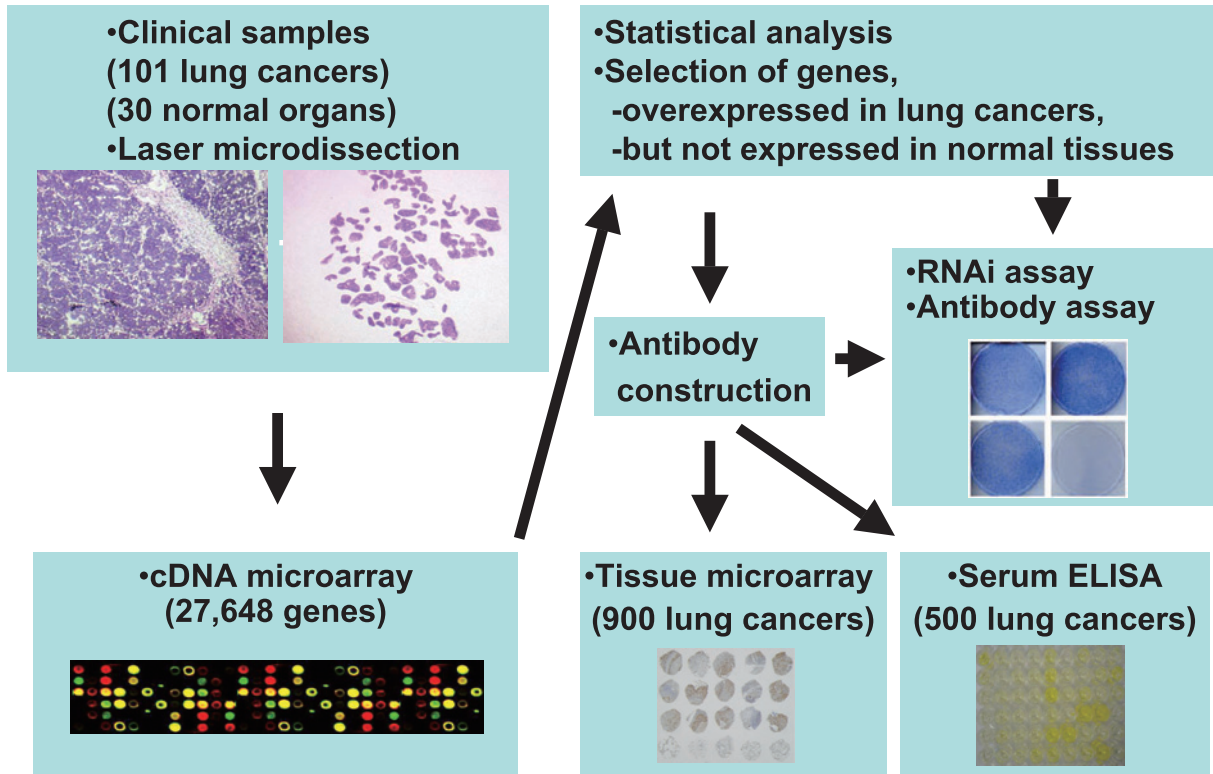


Figure 2. Strategy for molecular target discovery.

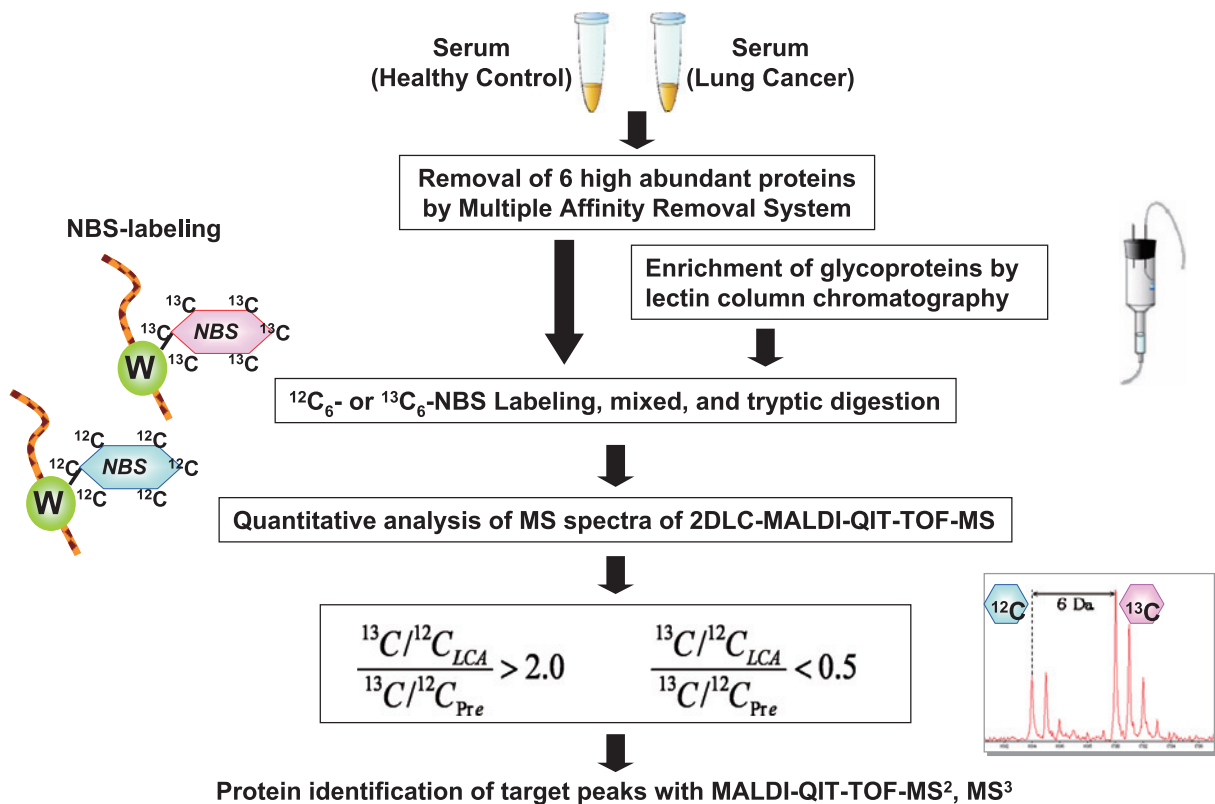


Figure 3. Screening system for carbohydrate-targeting serum biomarkers (Ueda et al⁷).

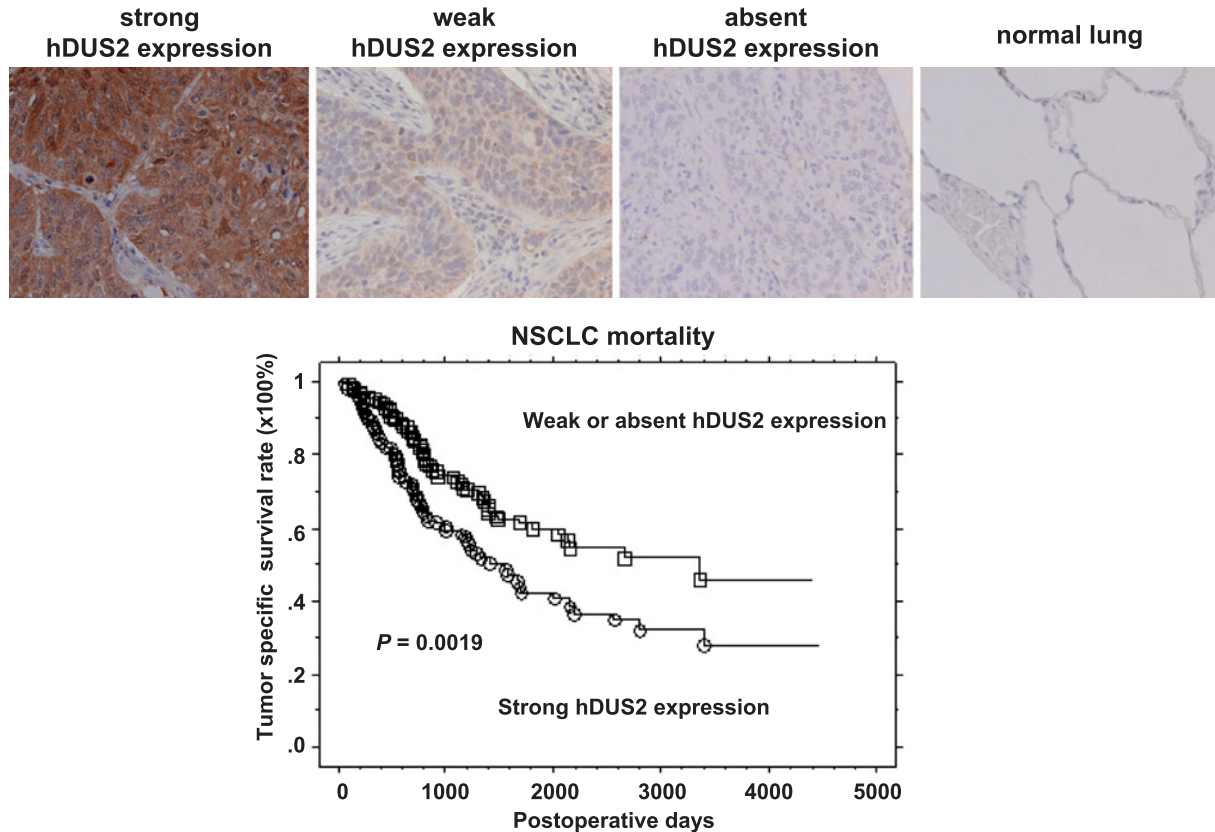


Figure 4. Association of hDUS2 (human tRNA-dihydrouridine synthase 2) over-expression with poor prognosis (Kato et al¹⁵). Top: immunohistochemical evaluation of representative samples from surgically resected NSCLC (non-small cell lung cancer) tissues, using an anti-hDUS2 antibody on tissue microarrays. Examples are shown of strong, weak, and absent hDUS2 expression in lung SCCs (squamous cell carcinomas), and of no expression in normal lung ($\times 200$). Bottom: Kaplan-Meier analysis of tumor-specific survival times among NSCLC patients in relation to hDUS2 expression.

癌細胞の増殖や悪性化に関わる oncoantigen であり、血清・組織試料を検査対象とした肺癌の未病状態や早期癌検出、分子病態診断に有用なバイオマーカーの開発と各種の創薬研究に応用可能である。

(2) 肺癌の新規バイオマーカーの探索

肺癌は悪性腫瘍による死亡数の第1位（年間死亡数約6万3000人）であり、壮年期に好発し早期発見がまだ困難なこと、また根治的手術後も高率に再発し予後不良であることから、より各患者の分子病態に基づいた定量的な評価による発症予防（発癌リスク診断）と未病状態・早期癌の検出（癌の存在診断）、さらには患者の予後、治療反応性、副作用予測に基づいた適切な集学的治療（手術・化学療法・放射線療法）の選択指標（癌の病態診断）の開発が必要である。2005年3月に米国食品医薬局（Food and Drug Administration：FDA）が新薬の開発と既承認薬におけるファーマコゲノミクス（薬の作用とゲノム情報を結びつけて特定の患者の治療効果、副作用に関連する要因を見だし各患者に最適の薬剤を使い分け

る研究）のデータ提出を推奨するガイダンスを公表したことで例示される通り、癌の診断・治療に応用可能なバイオマーカー（病気の診断、治療の選択・効果判定などの指標に用いられる組織、体液中で客観的に測定される生体物質）は癌克服に向けた最有力の基盤資源と認識されている。我々は、以下に概説する通り肺癌組織および血清における網羅的な遺伝子・タンパク質の発現・修飾情報に基づきバイオマーカー探索を進めている。

1) 血清マーカー

血清を利用した早期癌診断法の開発に向けて、5種類の肺癌の血清バイオマーカー（LY6K, DKK1, ADAM8, TGFA, AREG）を同定し、ELISA法による肺癌診断や抗癌剤感受性予測における有用性を示している^{14,17,24,27}。これらの新規血清バイオマーカー単独での陽性率は、非小細胞肺癌患者で34～70%、小細胞肺癌患者で56～69%であり、一方偽陽性率は4.1～5.5%であった。またこれらのマーカーは既存の血清腫瘍マーカーと有意な相関を認めないことから、現在開発中の血清バイオマーカーも加えた複数の組み合わせによる高感度・特異度の統合的血

Table 1. Diagnostic and Therapeutic Targets Identified by Genome-wide Gene Expression Analyses

Symbol	Gene name	References
<i>Enzyme</i>		
COX17	Cytochrome c oxidase assembly homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cancer Res. 63:7038-41, 2003
hDUS2	Human tRNA-dihydrouridine synthase 2	Cancer Res. 65:5638-46, 2005
MAPJD	Myc-associated protein with JmjC domain	Mol Cancer Ther. 6:542-51, 2007
<i>Signal transduction, cell proliferation</i>		
TGFA	Transforming growth factor-alpha	Hum Mol Genet. 13:3029-43, 2004
AREG	Amphiregulin	Cancer Res. 65:9176-84, 2005
ANLN	Homologue of anillin, an actin-binding protein in <i>Drosophila</i>	Cancer Res. 65:11314-25, 2005
NMU	Neuromedin U	Cancer Res. 66:9408-19, 2006
GHSR1b	Growth hormone secretagogue receptor 1b	same as above
NTSR1	Neurotensin receptor 1	same as above
FOXM1	Forkhead box M1	same as above
DKK1	Dickkopf-1	Cancer Res. 67:2517-25, 2007
LY6K	Lymphocyte antigen 6 complex locus K	Cancer Res. 67:11601-11, 2007
DLX5	Distal-less homeobox 5	Clin Cancer Res. 14:2363-70, 2008
<i>Cell motility, attachment</i>		
ADAM8	Disintegrin and metalloproteinase domain 8	Clin Cancer Res. 10:8363-70, 2004
PKP3	Plakophilin 3	Cancer Res. 65:7102-10, 2005
SEZ6L2	Seizure-related 6 homolog (mouse)-like 2	Cancer Sci. 97:737-45, 2006
Nectin-4	Nectin-4	Cancer Res. 69:6694-703, 2009
<i>Intracellular transport</i>		
IMP-1	Insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1	Clin Cancer Res. 13:434-42, 2007
KIF4A	Kinesin family member 4A	Clin Cancer Res. 13:6624-31, 2007
<i>Genome stability, chromatin dynamics</i>		
CDCA1	Cell division cycle associated 1	Cancer Res. 66:10339-48, 2006
KNTC2	Kinetochore associated 2	same as above
CDCA8	Cell division cycle associated 8	Cancer Res. 67:4113-22, 2007
HJURP	Holliday junction recognizing protein	Cancer Res. 67:8544-53, 2007 Cell. 137:485-97, 2009
FGFR1OP	Fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner	Cancer Sci. 98:1902-13, 2007
ECT2	Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	Clin Cancer Res. 15:256-66, 2009
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	Clin Cancer Res. 2009 in press

清診断法の開発を進めている。

2) 予後予測マーカー

標的分子の生物学的・臨床病理学的意義を検討するために組織マイクロアレイを用いて原発性肺癌におけるタンパク質の発現・相関解析を進め、これまでに20種類の免疫組織化学的予後予測マーカー (hDUS2, PKP3, ANLN, SEZ6L2, NMU, CDCA1, KNTC2, FGFR1OP, IMP-1, KIF4A, DKK1, CDCA8, AURKB, HJURP, LY6K, DLX5, FOXM1, ECT2, Nectin-4, WDHD1) を同定するとともに (Figure 4, Table 1), 複数のマーカーの組み合わせによる定量的な予後予測システムの開発を進めている。¹⁴⁻²⁸

3) 転移予測・検出マーカー

転移治療においては、診断時や病勢モニタリング時における転移の危険性の予知、転移の早期検出とその進展

度の正確な把握、そして診断に基づいたすみやかな予防処置、加療が求められるが、現状では切除されたリンパ節の病理学的な診断と各臓器の画像診断が唯一確立された転移検出法である。我々は非小細胞肺癌の原発巣の40個の遺伝子の発現プロファイルのスコア結果から、リンパ節転移の有無を検出する診断システムを構築するとともに、非小細胞肺癌の脳転移、小細胞肺癌の遠隔臓器転移に関わる遺伝子群を複数同定している。^{8,9,12}

4) 抗癌剤感受性診断マーカー

7種類の抗癌剤 (docetaxel, paclitaxel, irinotecan, cisplatin, gemcitabine, vinorelbine, gefitinib) に対する肺癌の感受性に関わる遺伝子群を同定している。^{8,10,17} また進行期非小細胞肺癌33症例の遺伝子発現プロファイル解析を行い、gefitinib感受性群と耐性群で発現レベルが異なる分子を抽出し、100%近い感度のgefitinib感受性

Suppression of growth of lung cancer cells by siRNA against hDUS2

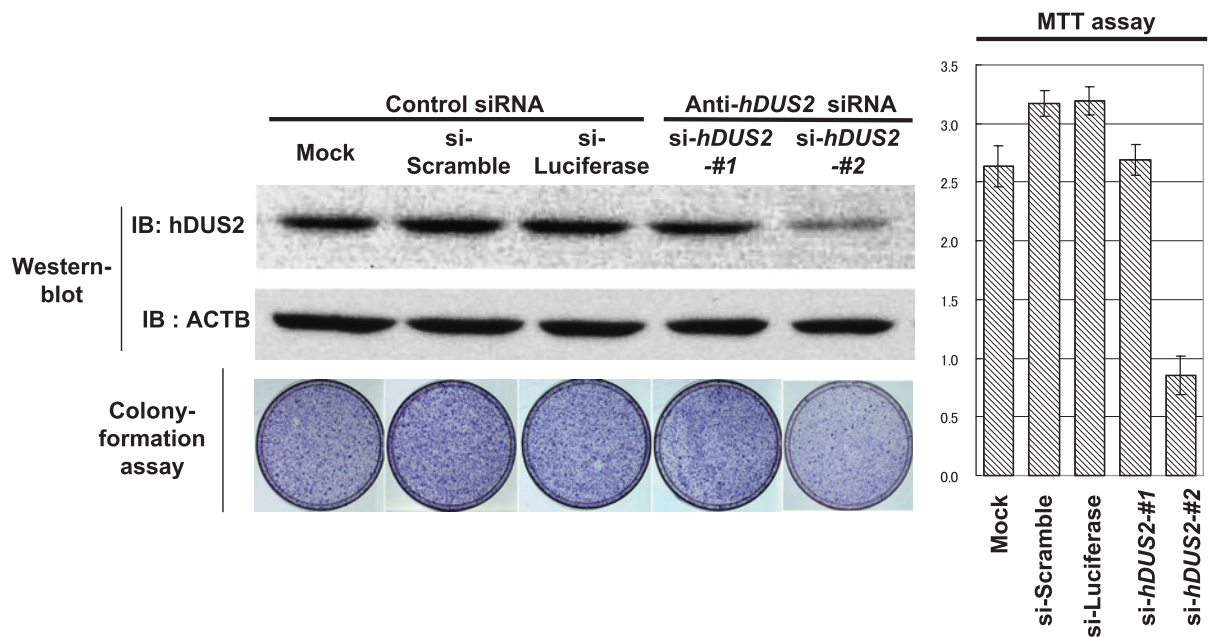


Figure 5. Inhibition of growth of lung cancer cells by siRNA for *hDUS2* (Kato et al¹⁵). Response of A549 cells to si-*hDUS2* or control siRNAs (si-Scramble or si-Luciferase) or mock vector, analyzed by Western blotting (left top), colony-formation assays (left bottom), and MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays (right).

予測システムを構築した.¹⁰ さらにこれらの中で耐性群の肺癌組織で発現が増加する EGFR (epidermal growth factor receptor) のリガンド TGF α (transforming growth factor alpha) と AREG (amphiregulin) の血清高値が gefitinib の低奏効率と予後不良因子であることを明らかにしている.¹⁷ これらの診断系については前向き試験による検証を進め、より低侵襲な血清診断により薬剤投与前にその抗腫瘍効果を予測し最適な治療を選択する個別化医療の開発を進めている。

5) 糖鎖標的腫瘍マーカー

血清試料の質量分析では、含有されている各種タンパク質の広範な濃度スケール (10^9 オーダー) と複雑なタンパク質組成にその検出力の大部分を阻害されることから、癌患者血清中に特異的に出現する微量タンパク質やペプチドの同定技術の開発と標準化が切望されている。我々はこの問題を克服するアプローチのひとつとして、癌細胞特異的なタンパク質の化学修飾変化(糖鎖など)を指標とした診断技術の開発を進めている。これまでに血清タンパク質上の糖鎖構造変化を網羅的かつ定量的に同定する新規グライコム解析法を構築した。^{6,7} 我々が構築した解析システムは、抗体カラムを用いた血清多量タンパク質の除去、レクチンカラムによる目的糖タンパク質の濃縮、NBS (2-nitrobenzenesulfonyl) 安定同位体ラベル法、MALDI-QIT-TOF (matrix-assisted laser desorp-

tion/ionization quadrupole ion trap time-of-flight) 質量分析による定量解析およびタンパク質同定により構成され、血清タンパク質上の糖鎖構造変化を網羅的かつ定量的に同定することが可能である (Figure 3)。このシステムを用いて肺癌患者血清で alpha1-6 フコシル化率の変動が健常者血清と比較し有意に認められる 34 個のタンパク質を同定した。さらにより多検体の迅速解析を可能とするために、血清中の目的糖タンパク質の濃縮をレクチン付加 ProteinChip 上で行う SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight) 質量分析システムを構築している。

6) 未病状態と疾患増悪の早期感知に基づいた統合的病態診断系の構築

「未病」とは一般に「自覚症状はないが検査(一般・特殊・遺伝子検査)では異常がある状態」と「自覚症状はあるが検査では異常がない状態」に大別される。重篤疾患を未病状態で検出することは疾患の種類や危険因子の有無を問わず最も有効な医学的介入であり、疾患の予防・重症化回避・根治を可能にする。我々は癌の未病状態および疾患増悪を早期に感知するバイオマーカーの開発とその迅速な予防・診断・治療への臨床展開をめざして、バイオバンクジャパン(オーダーメイド医療実現化プロジェクト)、神奈川がん臨床研究・情報機構(神奈川県立がんセンター内)で経年的に収集され詳細な臨床情

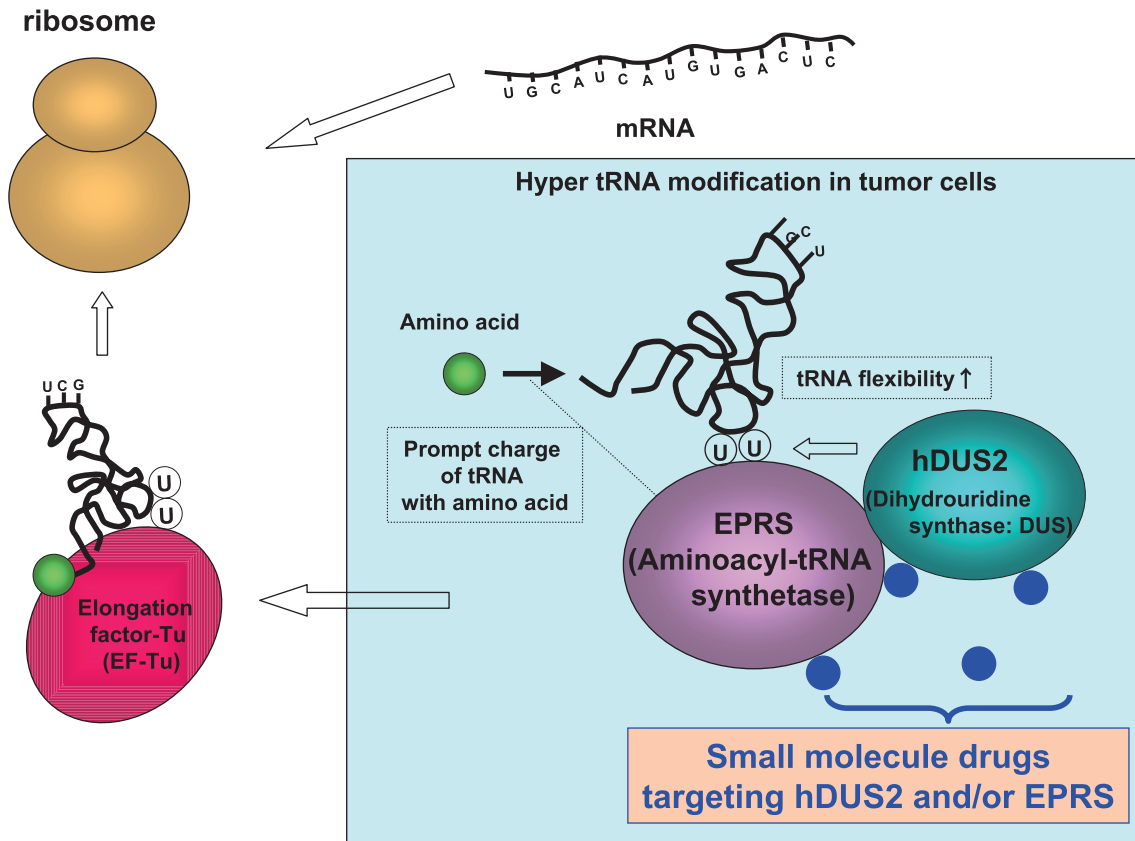


Figure 6. Schematic model for the mechanism of hyper-modification of tRNA by the hDUS2-EPRS (Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase) complex in lung-cancer cells, and possible therapeutic approach using small molecule drugs targeting this pathway. The complex of tRNA-DUS and aminoacyl-tRNA synthetase (hDUS2 and EPRS) promotes the synthesis of tRNA-dihydrouridine in tumor cells, increasing the conformational flexibility of the tRNA and promptly charging tRNAs with their cognate amino acids. This model implies that proliferating cancer cells could effectively activate translation of mRNAs, as a consequence of growth/survival allowed by the complex of aminoacyl-tRNA synthetase and over-expressed tRNA-DUS.

報を備えた肺癌患者試料（発症前，発症後，治療前後，再発など）の解析を進めている。併行して，これまでに同定した各種バイオマーカーの特性（早期癌検出，癌の病態診断：予後，転移，抗癌剤感受性）を最大限に生かした肺癌患者の生命予後の延長に寄与しうる統合的な癌病態診断システムの構築を進めている。

(3) 肺癌の新規治療法の開発研究

新薬開発は莫大な研究開発投資を必要とするが，一方で副作用発現による開発過程での断念や上市後の販売中止のリスクを常に負っている。新薬開発リスクとコストを低減し，創薬展開の加速を図るには，臨床開発に移行する前段階において，ヒトでの安全性，有効性が期待できる製剤（低分子薬，抗体医薬，ペプチド・核酸医薬，癌ワクチンなど）の設計を可能とする戦略と技術開発が必要である。癌治療薬の開発においては，病気の発症や

病態に関係する癌でのみ活性化した oncoantigen を開発の初期段階で同定し，それを標的とした創薬の可能性を基礎研究段階で検証することは，エビデンスに基づく創薬戦略のひとつとして重要である。引き続き標的分子に作用する低分子薬開発の迅速化には，タンパク質の立体構造解析，タンパク質間相互作用解析，計算科学においてさらなる画期的な技術革新が望まれる。また抗体医薬やペプチド・核酸医薬においては，生体内で抗腫瘍活性を發揮させる至適製剤化技術と薬物送達システム（drug delivery system：DDS）の開発が必要であり，さらに実用化には大量生産を可能にする技術革新が求められる。

1) 治療標的分子の同定と治療薬開発へ向けた分子経路の解明

我々は癌治療薬開発を念頭においた以下の基準を満たす複数の新規癌関連遺伝子を同定し，肺癌の未知の分子経路の解明に取り組んでいる（1. 癌遺伝子的機能を有す

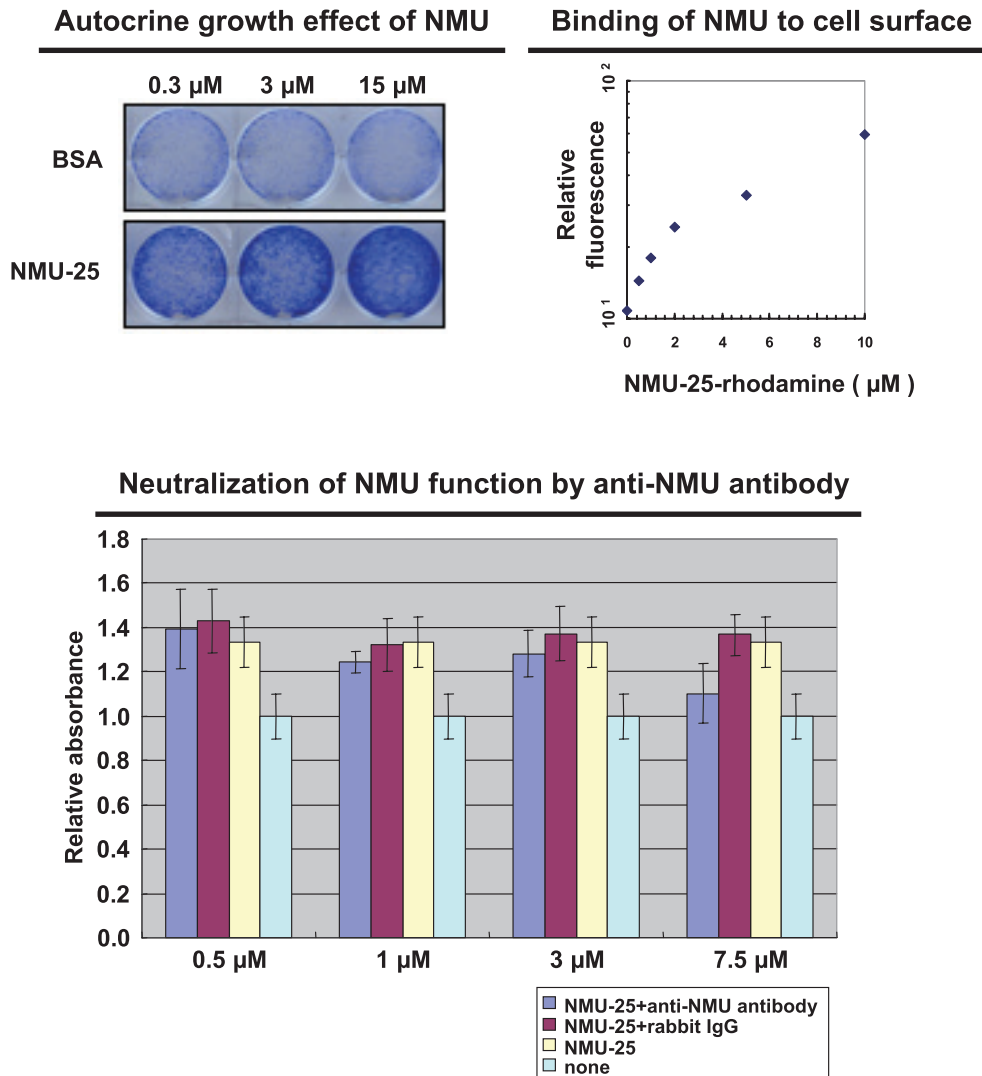


Figure 7. Autocrine effect of NMU (neuromedin U) on growth of mammalian cells (Takahashi et al¹⁹). Left top: cell numbers counted by colony-formation assays (COS-7 cells treated with NMU-25 in final concentrations of 0.3-15 μ M). Right top: flow cytometric analysis detecting the levels of rhodamine-labeled NMU-25 peptide bound to the surface of COS-7 cells (0-10 μ M; y-axis). Bottom: MTT assay evaluating the competitive-binding effect of anti-NMU antibody (0.5-7.5 μ M; y-axis) on the activity of NMU-25 peptide (3 μ M) in the culture medium of COS-7 cells.

る。2. 遺伝子産物量を減少させると細胞周期の停止, 染色体不安定化, 細胞老化, もしくはアポトーシスが誘導される。3. 正常細胞では発現がないか, 性腺・胎児組織のみで発現する, いわゆる癌・精巢・胎児抗原)。これまでに肺癌細胞の増殖・浸潤などに関わる oncoantigen をコードする 23 種類の癌遺伝子 (oncogene) を同定し (COX17, ADAM8, hDUS2, PKP3, ANLN, NMU, GHSR1b, NTSR1, FOXM1, CDCA1, KNTC2, FGFR1OP, MAPJD, IMP-1, KIF4A, DKK1, CDCA8, HJURP, LY6K, DLX5, ECT2, Nectin-4, WDHD1), これらの分子が関わる肺癌の発生・悪性化機構を明らかにしている。^{13-16,18-30} 同定

した肺癌関連分子の主要な機能は, 細胞周期に関わる基質に対する酵素活性, シグナル伝達・細胞増殖促進能, 細胞接着・運動促進能, 細胞内物質輸送能, ゲノム安定化・染色体動態制御能の 5 群に大別される (Table 1)。これらの標的分子についてはその細胞内局在, 機能, 免疫原性など, それぞれの特性に応じた創薬研究を進めている。以下にそれぞれの取り組みの一部を例示する。

2) 低分子薬

低分子化合物を用いた医薬品の開発においては, 候補治療標的分子の酵素活性の検討, 結合するタンパク質の同定, 癌遺伝子的機能を評価するためのアッセイ系の樹

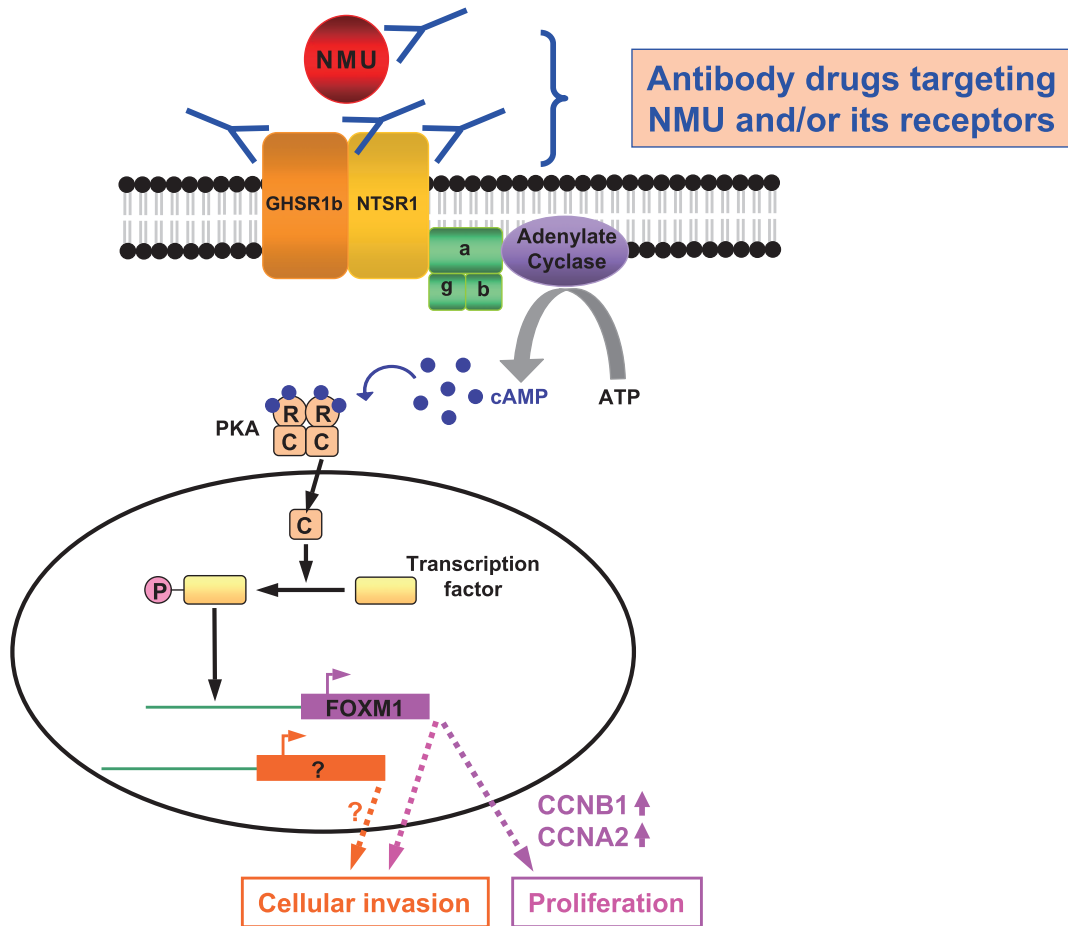


Figure 8. Schematic model for promotion of cancer-cell growth and invasion through the autocrine/paracrine NMU-GHSR1b/NTSR1 oncogenic signaling pathway, and possible therapeutic approach using antibody drugs targeting this pathway. Binding of NMU to GHSR1b/NTSR1 hetero-dimer might lead to the activation of adenylate cyclase, accumulation of intracellular cAMP, and activation of cAMP-dependent PKA. The release of catalytic subunits of PKA (C) from the regulatory subunits (R) might transactivate downstream *FOXM1* and subsequently *CCNA2* and *CCNB1* genes, and finally enhance the growth activity of cancer cells.

立などを行い、次の段階で酵素阻害薬、タンパク質相互作用阻害薬、その他の機能阻害薬の化合物スクリーニングに移行することになる。またこの過程においてペプチド・核酸医薬品の開発に有用な情報が得られる。治療標的分子のひとつとして同定した hDUS2 (human tRNA-dihydrouridine synthase 2) は、肺癌において高頻度に発現上昇を認める分子である。¹⁵ 肺癌組織マイクロアレイ解析による検討では、hDUS2 が高レベルに発現している非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer : NSCLC) 症例は有意に術後の予後が不良であった (Figure 4)。hDUS2 遺伝子に対する siRNA を肺癌細胞株に導入した結果、細胞増殖の抑制が認められた (Figure 5)。さらに hDUS2 タンパク質がアミノアシル tRNA 合成酵素である EPRS (glutamyl-prolyl tRNA synthetase) と複合体を形成して

tRNA の D-loop に存在するウリジン残基を dihydrouridine に変換し、tRNA の flexibility をあげることで癌細胞のタンパク質合成を促進し細胞増殖に寄与することが明らかになった (Figure 6)。このような癌細胞特異的な酵素活性を選択的に阻害する低分子化合物は、副作用の少ない有望な肺癌治療薬となる可能性がある。

3) 抗体医薬

癌細胞特異的に発現する細胞膜タンパク質、細胞増殖因子として働く分泌タンパク質は抗体医薬の有用な標的分子と考えられる。分泌タンパク質 NMU (neuromedin U) は肺癌細胞で高レベルに発現し、肺癌で発現上昇を認める G-protein coupled receptor (GPCR) の NTSR1 と GHSR1b のヘテロ複合体と細胞表面で相互作用して autocrine/paracrine 的に癌細胞の増殖シグナルを活性

化することを明らかとした (Figure 7, 8).¹⁹ また抗 NMU 抗体を培養液中に添加することにより NMU 依存性の細胞増殖が抑制できることから NMU およびそのレセプターを介したシグナル伝達経路は抗体療法の有望な標的と考えられる (Figure 7, 8). 抗体医薬開発においては、製造過程が複雑でその能力を持つ企業が世界で限られており、開発の障壁になる製造関連特許が多数存在する。ゆえに前臨床試験の段階で十分にその有用性を確認された独自の抗体を作製、確保する必要がある。我々は *In vitro/In vivo* のアッセイ系で抗体療法の有望標的分子を同定した場合、マウスモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体の作製に段階的に移行し、創薬を念頭においた抗体の評価と標的分子経路の機能解析を進めている。

4) 癌ワクチン

現在の主要な癌治療法（外科的切除術，化学療法，放射線療法）の改良・新規開発に加えて，生体への侵襲が少なく患者が本来有する癌特異的な免疫能を最大限に活用する癌免疫療法が実用化されれば，既存の治療法の根治性や進行癌・治療抵抗性腫瘍の治療成績の向上に繋がると期待される。我々は癌と精巢などの生殖細胞のみで発現を示す標的分子のアミノ酸配列から，免疫細胞で抗原提示される可能性のある 9~10 アミノ酸のペプチド（タンパク質の一部）を予測し，この中から T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes : CTLs) が殺腫瘍細胞活性を誘導するペプチドを同定して癌ペプチドワクチンの開発を進めている。これまでに 3 種類の癌精巢抗原由来の HLA-A*2402 結合性ペプチドが抗腫瘍免疫を誘導することを明らかにしており，^{29,30} 現在，これらの新規腫瘍抗原を使用した新しい癌免疫療法の開発に向け，肺癌，食道癌を対象とした第 I 相試験を東京大学医科学研究所および国内の複数の医療機関と共同で進めている。

5) ペプチド・核酸医薬

上記の 23 種類の治療標的分子に対する siRNA を肺癌細胞株に導入してその発現を阻害することで細胞増殖の抑制を認めており，これらの siRNA は核酸医薬の開発基盤となると期待される。また一部の分子については，その相互作用タンパク質との結合部位もしくは上流のキナーゼによりリン酸化を受ける部位（いずれも ~20 アミノ酸）と 11 個のアルギニン（膜透過性配列）を融合した細胞膜透過性ペプチドを作成し，それぞれ肺癌細胞株の培養液中に添加することによりタンパク質間の相互作用 (CDCA1-KNTC2) や酵素-基質反応 (CDCA8-AURKB) を阻害して癌細胞増殖を抑制することを確認している。siRNA をはじめとする核酸医薬や生理活性物質などのペプチド医薬は，原末のままでは不安定であり体内では短時間に分解される。実際これまでに認可された核酸医

薬である Vitravene (antisense ; AIDS 患者のサイトメガロウイルス性網膜炎) や Macugen (RNA aptamer ; 加齢性黄斑変性症) などは局所投与で効果を発揮する。近年の核酸・タンパク質の構造改変技術とリボソーム，MEND (multifunctional envelope-type nano device) などの DDS の発達がこの問題を基礎研究段階では改善しつつある。一方，これらの医薬品は疾患と遺伝子・タンパク質の関係が明らかになった段階で開発の道が開くことやアンチセンス DNA 医薬の知見が利用可能な点，そして siRNA の基本特許などは一部企業に押さえられているにせよ，関連する基礎研究の主体が企業だけではなく多彩な分野に広がっている点で，低分子化合物などの開発と決定的に異なる。今後は off-target effect がなく個体に副作用を生じさせない至適量の薬剤を腫瘍部に選択的に移行させる DDS や製剤技術の開発が期待される。

まとめ

臨床応用をめざした肺癌の体系的発現情報解析から新規バイオマーカーの開発と治療標的分子の機能的検証過程を例示した。今日，ヒトゲノムの全塩基配列決定と技術革新の著しいオミックス解析技術は，生体における遺伝子・タンパク質の量的・質的変化の体系的な把握を可能にしておき，疾患の発症から進行に至る経過を正確に把握する分子病態診断や有効性が高く副作用の少ない医薬品開発，そして患者ごとに適切な治療法を提供する個別化医療の開発研究の主要基盤となっている。今後，集積されてくる知見の迅速な臨床応用に向けて，よりいっそうの学際的研究・開発の推進と産学官の連携体制の構築が求められる。

REFERENCES

1. Daigo Y, Nakamura Y. From cancer genomics to thoracic oncology: discovery of new biomarkers and therapeutic targets for lung and esophageal carcinoma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;56:43-53.
2. 醍醐弥太郎, 中村祐輔. 遺伝子発現情報に基づいた個別化医療の試み, 分子呼吸器病. 2007;11:141-147.
3. 醍醐弥太郎, 中村祐輔. 体系的遺伝子発現情報解析による肺癌の新規診断・治療標的分子の同定とその臨床展開. MOOK 肺癌の臨床 2008-2009. 東京: 篠原出版新社; 2008:57-66.
4. 醍醐弥太郎, 中村祐輔. 新しい治療法の開発に向けた肺癌の分子病態理解: 遺伝子発現情報解析からの知見. 医学のあゆみ. 2008;224:991-997.
5. 醍醐弥太郎, 中村祐輔. 肺癌の新規バイオマーカー探索. THE LUNG perspectives. 2008;16:513-519.
6. 植田幸嗣, 醍醐弥太郎, 中村祐輔. 肺癌における糖鎖標的腫瘍マーカーの探索. 実験医学. 2007;25:2747-2753.
7. Ueda K, Katagiri T, Shimada T, Irie S, Sato TA, Nakamura Y, et al. Comparative profiling of serum glycoproteome by sequential purification of glycoproteins

- and 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) stable isotope labeling: a new approach for the novel biomarker discovery for cancer. *J Proteome Res.* 2007;6:3475-3483.
8. Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, et al. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: Identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene.* 2003;22:2192-2205.
 9. Kakiuchi S, Daigo Y, Tsunoda T, Yano S, Sone S, Nakamura Y. Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice. *Mol Cancer Res.* 2003;1:485-499.
 10. Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, Furukawa C, Tsunoda T, Yano S, et al. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet.* 2004;13:3029-3043.
 11. Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, Takano A, Tsunoda T, Yasui W, et al. Gene expression profiles of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer. *Int J Oncol.* 2006;29:567-575.
 12. Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, Katagiri T, Tsunoda T, Yoshida S, et al. Expression profiles of metastatic brain tumor from lung adenocarcinomas on cDNA microarray. *Int J Oncol.* 2006;28:799-805.
 13. Suzuki C, Daigo Y, Kikuchi T, Katagiri T, Nakamura Y. Identification of COX17 as a therapeutic target for non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003;63:7038-7041.
 14. Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, et al. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8363-8370.
 15. Kato T, Daigo Y, Hayama S, Ishikawa N, Yamabuki T, Ito T, et al. A novel human tRNA-dihydrouridine synthase involved in pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65:5638-5646.
 16. Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Ito T, Tsuchiya E, et al. Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7102-7110.
 17. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, et al. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2005;65:9176-9184.
 18. Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Ito T, et al. ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Res.* 2005;65:11314-11325.
 19. Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, et al. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66:9408-9419.
 20. Hayama S, Daigo Y, Kato T, Ishikawa N, Yamabuki T, Miyamoto M, et al. Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res.* 2006;66:10339-10348.
 21. Suzuki C, Takahashi K, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Ito T, et al. Identification of Myc-associated protein with JmjC domain as a novel therapeutic target oncogene for lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:542-551.
 22. Kato T, Hayama S, Yamabuki T, Ishikawa N, Miyamoto M, Ito T, et al. Increased expression of insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein 1 is associated with tumor progression in patients with lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:434-442.
 23. Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, Yasui W, Inai K, Nishimura H, et al. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6624-6631.
 24. Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, et al. Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2007;67:2517-2525.
 25. Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, et al. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67:4113-4122.
 26. Kato T, Sato N, Hayama S, Yamabuki T, Ito T, Miyamoto M, et al. Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67:8544-8553.
 27. Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, et al. Cancer-testis antigen lymphocyte antigen 6 complex locus K is a serologic biomarker and a therapeutic target for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2007;67:11601-11611.
 28. Kato T, Sato N, Takano A, Miyamoto M, Nishimura H, Tsuchiya E, et al. Activation of placenta-specific transcription factor distal-less homeobox 5 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2363-2370.
 29. Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y, Tahara H. Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2007;67:11601-11611.
 30. Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, et al. Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008;99:1448-1454.