

2012 年度日本臨床薬理学会海外研修員報告： 研修完了報告書

山出 美穂子

研修先：National Institutes of Health, National Cancer Institute, USA

(指導者) Dr. Yves Pommier, Developmental Therapeutics Branch and Laboratory of Molecular Pharmacology,
Center for Cancer Research

研修内容：上皮間葉転換 (EMT) に関連した遺伝子発現を有することより見出された新規遺伝子の機能解析

研修期間：2012 年 10 月～2016 年 3 月

現所属：浜松医科大学医学部臨床腫瘍学講座，内科学第一講座（消化器内科）

1. はじめに

この度、米国 National Institutes of Health (NIH), National Cancer Institute (NCI) の Developmental Therapeutics Branch and Laboratory of Molecular Pharmacology (DTB/LMP) における海外研修を終え、無事帰国いたしました。当初、2 年の研修予定でしたが、2014 年に進行中の実験を進めるため期間延長の方針となり、計 3 年半の研究生活を送ることができました。今回の留学に際し日本臨床薬理学会の海外研修員にご選考いただき、貴重な機会を与えていただきましたこと、心より感謝申し上げます。国内の研修では得難い数多くの貴重な経験をすることができました。本稿では以前の報告と重複する部分もごさいますが、研修を振り返り、留学の経緯、研修先の特徴、研究内容、得られた知見等につきましてご報告させていただきます。

2. 研修先について

NIH のある米国メリーランド州ベセスダは、首都ワシントン DC よりメトロで 20～30 分ほど北に位置する美しい街です。数多くのレストランがあり、週末には DC エリアからも人が集まり大変賑わいます。私はラボまで自転車または徒歩通勤できる距離に住むことをボスに勧められ、ベセスダのアパートを借りたのですが、とても治安がよく暮らしやすい街で助言をありがたく思ったものです。滞在中、車は所有しませんでした。免許を取得してからは週末のみ時間貸しの ZIP CAR やレンタカーを借り友人と買い物等にかけたのはよい気分転換となりました。

Dr. Yves Pommier は、抗腫瘍薬 topoisomerase 阻害薬の作用機序解明を行った方です。Dr. Pommier 率いる DTB/LMP

には複数の研究グループが存在し、遺伝子データ解析に基づく新たな癌薬物療法探索や、新規抗腫瘍薬のデザイン、分子生物学的な薬物作用機序の解明、癌特異的な遺伝子変異やエピジェネティックな変化に焦点をあてた基礎研究、新規抗腫瘍薬の機序および腫瘍の病態解明に着目したトランスレーショナルリサーチ、放射線治療と DNA 傷害の関連性、抗腫瘍薬治療前後の遺伝子発現・メチル化の解析等、さまざまなテーマで研究が行われていました。数名の Principal investigator (PI) 率いる複数の研究室があり、臨床試験に携わるグループは常時 40 以上の試験に関与していました。毎週行われるランチセミナーでは、現在進行中のさまざまな研究についての発表があり、他の方々の実験内容や進捗状況を伺うことで日常的にとってもよい刺激を受けました。また毎週のラボミーティングは 3 時間に迫ることもしばしばで、毎回議論は活発であり、休憩時間や終業後、ときにハッピーアワーで隣に座っただけの他のラボの研究者とも実験の話になることがあり、勤務時間外に実験のヒントを得ることもよくありました。研究テーマについて考え試行錯誤していくのに、とても恵まれた環境であったと思います。

所属するグループは 10 数名のポスドク、スタッフ、学生からなり、その出身地は多国籍で、滞在中の入れ替わりも含めフランス、イタリア、ドイツ、ロシア、トルコ、シリア、ガーナ、ベナン、インド、スリランカ、インドネシア、ブラジル、中国、台湾、韓国出身の同僚と働く機会がありました。ラボ内の雰囲気はよく、同僚たちと実験のトラブルシューティングや細かいプロトコルについて会話しやすい雰囲気もとてもありがたかったです。ごく少数の医師以

著者連絡先：山出美穂子 浜松医科大学医学部臨床腫瘍学講座 〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1

E-mail: miyamade@hama-med.ac.jp

投稿受付 2016 年 7 月 6 日、掲載決定 2016 年 7 月 7 日

ISSN 0388-1601 Copyright: ©2016 the Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics (JSCPT)

外は大部分が生粋の基礎研究者で、彼らの実験における知識や経験は素晴らしく、新しい実験を始めるたび細かな手法について助言をいただけたことも感謝しています。ときには Dr. Pommier から他のラボを紹介していただき、新しく始める実験を教わりに行くこともありました。忙しいなか時間を作り、毎回気さくに相談に乗ってくださったラボ内外の方々の協力なしに、私の実験は進みませんでした。また各国の事情や文化の違いはもちろんのこと、仕事のやり方や物事の捉え方、人生論に至るまで興味深い会話ができ、とても貴重な体験となりました。さらに初年度は、Dr. Pommier の勧めで NIH 内の英会話教室にも通わせていただきました。NIH には春期秋期のさまざまなコースがあり、語学に留まらず新しい実験手法等について学ぶ講習も数多くありました。初年度の英会話コースではスペイン、ロシア、チリ等からの留学生と席を並べ国際情勢等をテーマに議論しあったのもよい経験となりました。海外生活や実験の進め方に関しての助言をいただける部署もあり、アドバイスをいただいたこともありました。研究者をサポートする体制が整っており、とても恵まれていたと振り返って思います。

3. NCI-60 解析, CellMiner との出合い

—研究テーマについて—

留学前は、浜松医科大学の大学院で胃癌における分子標的薬併用が抗腫瘍薬誘導 DNA 傷害に与える影響について研究していました。また、遺伝子多型や薬剤感受性に基く *Helicobacter pylori* 除菌の個別化治療にも携わっておりました。癌薬物療法の成績向上や個別化療法の推進に貢献できる研究がしたいと希望したところ、大学院修了後に指導者の古田隆久先生より研修先をご紹介いただき、Dr. Pommier のご快諾を得るとともに、日本臨床薬理学会の海外研修員にご選出いただき、今回の研修開始となりました。

研修を開始した 2012 年 10 月、研修先では NCI-60 cell lines の全エクソン解析が終了したところでした。ラボ内には複数名の Bioinformaticians (Bioinformatics 生命情報科学の専門家) からなるチームがあり、日常的に Biologist や Chemist と意見交換できる環境にあり、インターネット上のフリー解析プログラム CellMiner¹⁾の更新・解析や、論文等で公開されている DNA データ解析等を行っています。これは、代表的な 60 の癌細胞株として選択された NCI-60 cell lines の全 DNA/RNA/蛋白データと FDA 認可薬を含む 50,000 以上の化学物質との薬剤感受性試験データを解析できる、インターネットでアクセス・解析可能なフリーツールです。

ちょうど NCI-60 の全エクソン解析が終了し、ラボメンバーも CellMiner より見いだした新しい薬剤感受性遺伝子の可能性を示唆する研究を発表していたこともあり、研修開始時これらのミーティングにも何度も参加する機会を得

ました。ラボ内に、CellMiner を用いて癌の転移浸潤に関わる上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) 関連遺伝子の解析を行っていた Dr. Kurt Kohn がおられたこともあり、話し合いの結果、癌の転移浸潤を制御する新規 EMT 関連遺伝子が見つければ癌薬物療法の個別化治療に繋がるのではないかとという着眼点から、まず EMT 関連新規遺伝子を解析・検索することとなりました。

Bioinformatics やデータ解析に関わるのは初めてでしたので、ボスに助言をいただき研究会参加や Bioinformatics 専門家の手ほどきを受け、R プログラム等を使用してデータ解析を進めました。Dr. Kohn が EMT 関連遺伝子の特徴的な発現パターンについて見いだした結果をもとに解析を続け²⁾、強い関連をもつ遺伝子 A (仮称) について他の癌細胞株の遺伝子発現データ CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia)³⁾ や癌組織の発現データ TCGA (The Cancer Genome Atlas)⁴⁾ でも同様の強い関連を持つことを確認した後、分子生物学的手法を用いて実験を開始することになりました。

4. 癌の転移浸潤における EMT と遺伝子発現解析

初めに遺伝子 A を高発現させる遺伝子組み換え実験系を用い、既知の EMT 遺伝子発現を比較検討する実験を始めました。並行して、siRNA を用いて発現を knock down し比較検討していきました。さらに、細胞の移動能・浸潤能を調べる実験手法の得意なラボへ浸潤アッセイを教わりに行き、表現型の実験も開始しました。また micro RNA との関わりを検討したり、同時進行でラボ内の同僚の研究テーマに関してデータ解析を行っていきました。実験は当初想定したようには進まず、ラボ内外の皆様のご助言を受け軌道修正しつつ進めてまいりました。その中で siRNA による発現レベル低下が不十分であることも判明し、knock down ではなく knock out (KO) cell lines を作製することになりました。

2013 年に Science に掲載された CRISPR/Cas9 system による KO 細胞株作製は、瞬く間に一般的な遺伝子編集の手法として広まりました^{5,6)}。私もラボメンバーより同手法を教わり、遺伝子 A の KO 細胞株作製を開始しました。

3 カ月ほどで得られた複数の細胞株で KO による発現消失を確認し、Phenotype 比較の浸潤アッセイや関連遺伝子の発現レベル検索、DNA プロモータ領域への影響や RNA degradation への影響を調べてまいりました。その結果、私達の作製した KO 細胞は Wild type (WT) 細胞と比較して主要な EMT 関連遺伝子発現に影響し、また移動能・浸潤能にも関与することが示されました。仮説とは異なりますが、遺伝子 A が EMT に関連するという結果を得ることができ、現在論文を執筆中です。滞在中はラボメンバーの研究にも関わらせていただく機会があり、貴重な得がたい経験ができたことを感謝しております。

滞在1年余が経過した頃、予定の2年では実験結果が不十分であることが予測され、ご指導いただいております先生方と話し合いを重ね、研修を延長することになりました。臨床薬理学会には研修期間の延長を快くご承諾いただき感謝しております。また、海外研修員採用後に日本学術振興会の海外研究員にご採用いただき、3年目はラボのほうでも雇用していただけたため、より安定した生活基盤のうえで研究を続けることができました。改めて感謝申し上げます。留学3年目以降は、他のInstituteの研究者やDC・メリーランド州に勤務する他職種の日本人の方々ともお会いする機会を多数得ることができました。第一線の研究室で貴重な経験ができたことに加え、さまざまな年代の多様な職種の方々とお会いできたことも大きな刺激となり、考え方も生き方も影響されたと感じています。留学で得たことを、これからの臨床、研究等に生かしていきたいと思っております。

5. おわりに

この度は海外研修員という貴重な機会を与えていただき、日本臨床薬理学会の皆様にご心より感謝申し上げます。また研修を受け入れてくださったDr. Pommier、一緒

にご指導いただいたDr. Kohnをはじめ、数々のご助言を与えてくださったDTB/LMP内外のPIおよび研究者の皆様にも感謝申し上げます。そして、滞在中に出会い数多くのアドバイスと大きな影響を与えてくれたラボメンバー達と友人達に、この場を借りて御礼申し上げます。今後は留学で得たことを生かし、日本の臨床・研究に、また臨床薬理学会の発展に貢献できるよう尽力したいと思っております。

文 献

- 1) CellMiner. [<http://discover.nci.nih.gov/cellminer/analysis.do>]
- 2) Kohn KW, Zeeberg BM, Reinhold WC, Pommier Y. Gene expression correlations in human cancer cell lines define molecular interaction networks for epithelial phenotype. *PLoS One*. 2014; **9** (6): e99269. doi: 10.1371/journal.pone.0099269.
- 3) Cancer Cell Line Encyclopedia. [<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>]
- 4) The Cancer Genome Atlas. [<http://cancergenome.nih.gov>]
- 5) Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013; **339** (6121): 823-6. doi: 10.1126/science.1232033.
- 6) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; **339** (6121): 819-23. doi: 10.1126/science.1231143.