

# 脳腫瘍のシステムバイオロジー

白石哲也・田渕和雄・小谷秀示・小長谷明彦

遺伝子や蛋白質に関する情報が爆発的に増加しているが、それらの相互の関連性についての研究はほとんどなされていない。膠芽腫細胞におけるシステム異常を探る目的で、これまでの論文および筆者らの実験データを基に、FasL アポトーシス経路および細胞周期経路についてハイブリッドペトリネットモデルを用いてシミュレーションを試みた。一方、インターフェロン処理によるトランスクリプトームへの影響を GeneOntology によるサブシステムの変化として解析した。その結果、個々の遺伝子の機能のみならず、その遺伝子が働くサブシステムに注目することが膠芽腫細胞の特性を理解するうえできわめて重要であると考えられた。

**Key words** 脳腫瘍 システムバイオロジー ペトリネット

## ■ はじめに

悪性グリオーマは神経細胞とともに脳を構成するグリア細胞から発生する腫瘍の総称である。それらのなかでもとくにグリオブラストーマ(膠芽腫)は増大が速く、難治性であり、患者の生命予後は過去数十年間に有意に改善したとはいえず、現在も5年相対生存率が10%未満と、きわめて悲惨である。

膠芽腫細胞は正常脳への浸潤能が強く、多くの場合、発症時点ですでに脳の各所に浸潤しており、患部を手術で全摘出することができない。しかし、膠芽腫細胞が頭蓋外他臓器に転移することはきわめて稀であるため、局所でのコントロールが行なえる画期的な治療法が開発されれば、患者にとって大きな福音となる。

これまで膠芽腫細胞の特性を分子生物学的に解明する研究が精力的に行なわれ、悪性化に伴う経時的な遺伝子の発現異常や遺伝子変異が種々明らかにされてきた。しかしそれらは依然として腫瘍細胞の特性の部分像にとどまっており、解明された遺伝子変化が一定でなく、しかも必ずしも臨床像(予後や抗癌剤感受性など)と結びついているとはいえない。

その理由のひとつは、これまでの研究では個々の遺伝子や蛋白質の異常のみに注意が払われ、その他の多くの

遺伝子および蛋白質との相互関係への関心が限られていたことにあると考えられる。

ところで人体という複雑なシステムは、細胞という最小単位のシステムが集まって組織というサブシステムをつくり、それらのサブシステムが集まって器官となり、複数の器官が人体の生命活動を支えるというシステムの階層構造となっている。この階層構造はミクロの原子の世界から広くはマクロの社会全般に及んでいる。この階層構造は癌についても例外ではない。癌は遺伝子異常などのミクロのシステム異常が次々に上位のシステム異常をひき起こし、最終的には人体というシステムの破壊に至る病気であると考えられる。生物の階層構造を明らかにし、それらの関連性をダイナミックに把握することを目的とするシステム生物学的手法、システムバイオロジー[→今月のKey Words(p.794)]を癌の研究に取り入れることによって、従来の研究に対するブレイクスルーとなることが期待される。

本稿では脳腫瘍に関する基礎研究データや臨床データをシステムバイオロジーの観点からどのように解析できるかについて、筆者らが行なっているパイロットスタディを基に紹介するとともに、システムバイオロジーの可能性と課題についても言及する。

Tetsuya Shiraishi, Kazuo Tabuchi, 佐賀医科大学脳神経外科 E-mail: shiraish@post.saga-med.ac.jp  
Shuji Kotani, Akihiko Konagaya, 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター  
System biological approach to research and treatment of brain tumors

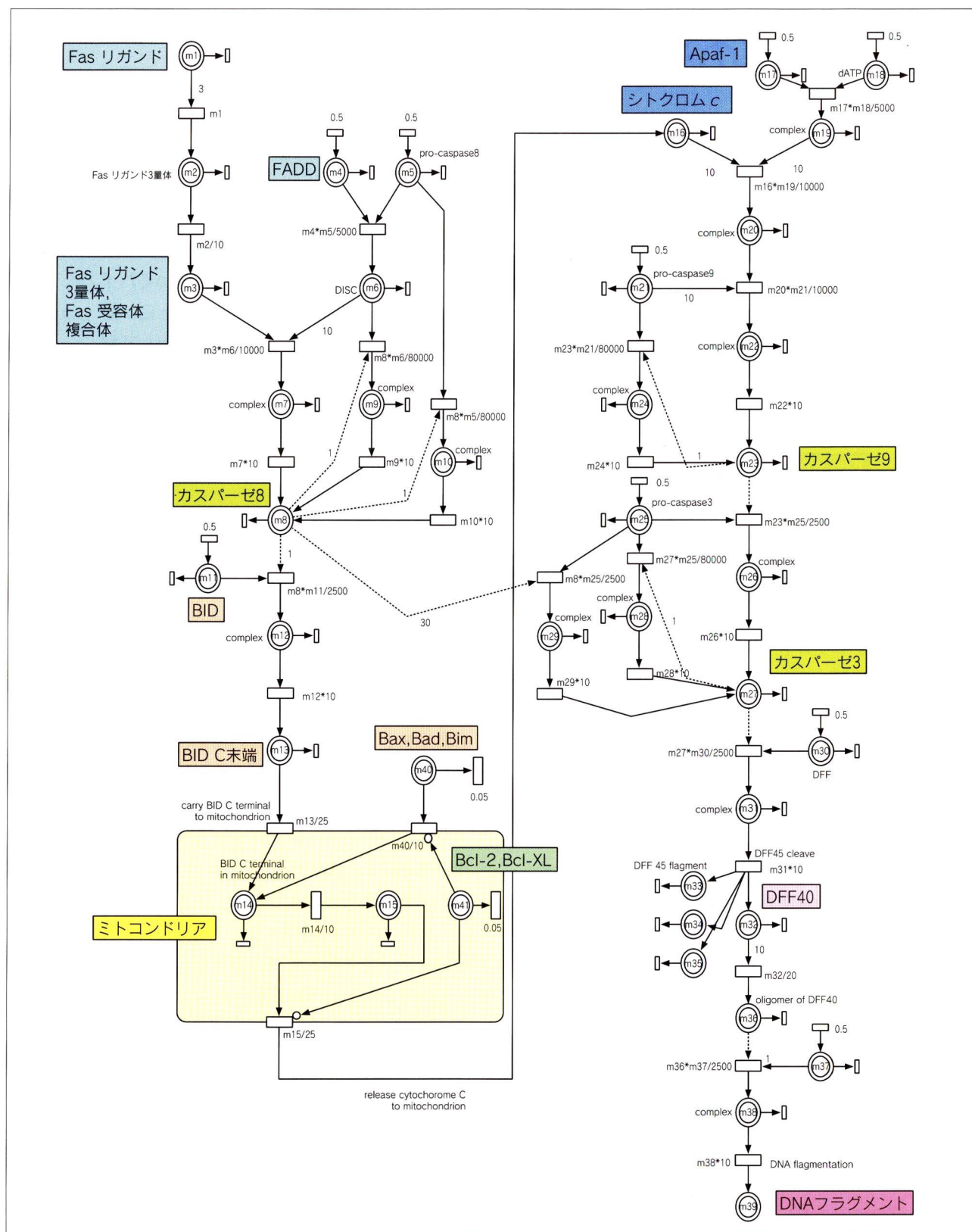


図 1 ハイブリッドペトリネットで表現した Fas/FasL アポトーシス経路

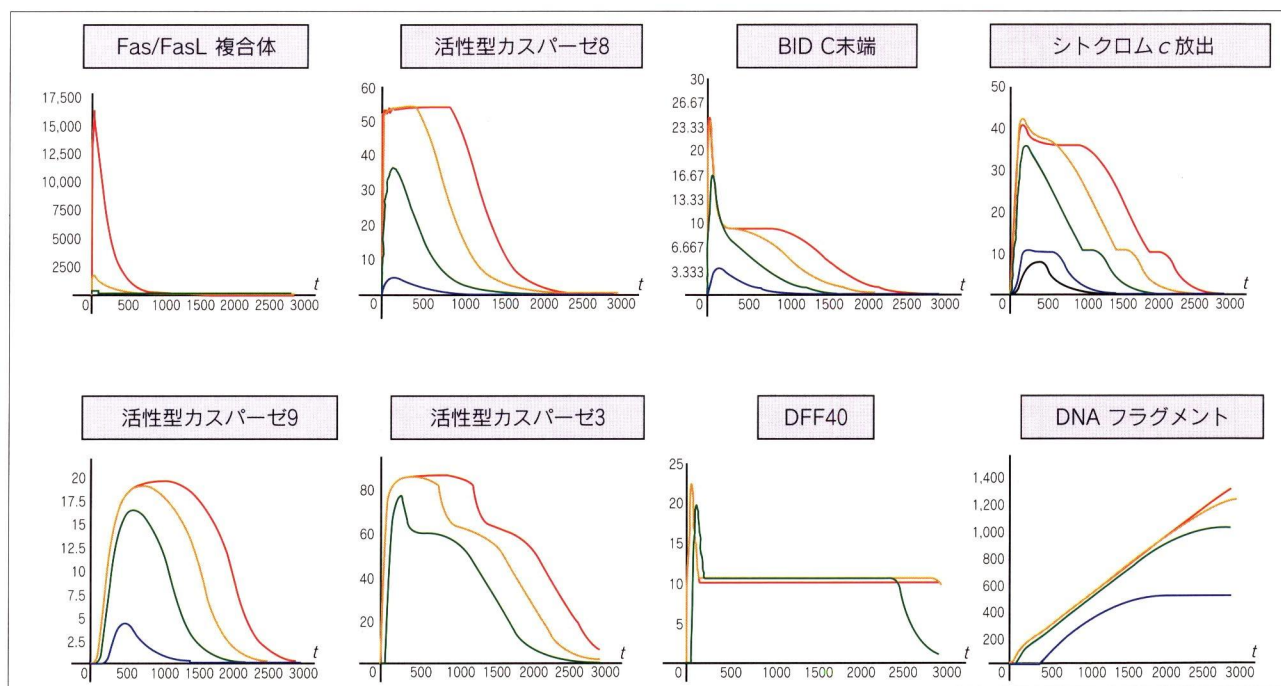


図2 Fas濃度(Fasの初期トークン値)の変化による各ブレースでのトークンの変化

初期トークン値：—：10，—：20，—：200，—：2,000，—：20,000。縦軸はトークン値を，横軸は単位時間を表す。

## I. ハイブリッドペトリネットによるシミュレーション

ポストシークエンス時代に入り，遺伝子や蛋白質などの情報が爆発的に増加している．しかしそれらが生物システム(個体)でどのような意味をもち，その変化が生体でどのような影響をもたらすのかを理解できなければ，膨大な情報に重要な意味をもたせることはできない．通常，われわれは注目する物質の背景にある物質間ネットワークをある程度意識して研究しているが，一度にイメージできるネットワークの数は限られている．そこで筆者らは生体分子のネットワークを比較的簡単に構築でき，変数を変えることで容易にシミュレートできるハイブリッドペトリネット(Hybrid Petri Net; HPN)<sup>1)</sup>に注目した．

ペトリネットとは2種類の節点(状態を表すブレースと事象に対応するトランジション)と重み付きの枝からなる有向グラフで表現されるシステムである<sup>2)</sup>(図1参照)．ブレースは円で表現され，その中にトークン(token)とよばれる正の整数を割り当てることで，ペトリネットの状態を表す．長方形で表わすトランジション

は，ブレース上のトークンの数がトランジションの要求する数をこえたときに発火し，その結果トークンが移動して，システムの状態が1つ変化する．この処理をくり返すことで，同時並行的な複雑な制御を統一的に記述することができる．

ペトリネットの概念が発表されて40年以上が経過しており，その間多くのバリエーションが開発されている．HPNはそのなかでも連続値をとるトークンと離散値をとるトークンを共存させたもので，生体分子ネットワークの記述に好都合かつ有用である．筆者らは脳腫瘍培養細胞を用いた文献データおよび筆者らの研究データをこのシステムでシミュレーションする試みを行っており，その一端を紹介する．

図1はGenomic Object Netのホームページ(<http://www.genomicobject.net/public/index.html>)にて公開されているFasLアポトーシス経路をHPNで表現したものである．筆者らが構築した高力価可溶性Fasリガンド(FasL)は濃度依存性に培養グリオーマ細胞に強いアポトーシス誘導能を示す<sup>3)</sup>が，それをFasリガンドを表わすブレースのトークンを変化させることで表現し，Genomic Object Net ver.0.919にてシミュレーションした(図2)．Fasリガンドの濃度が一定量をこえるとDNA

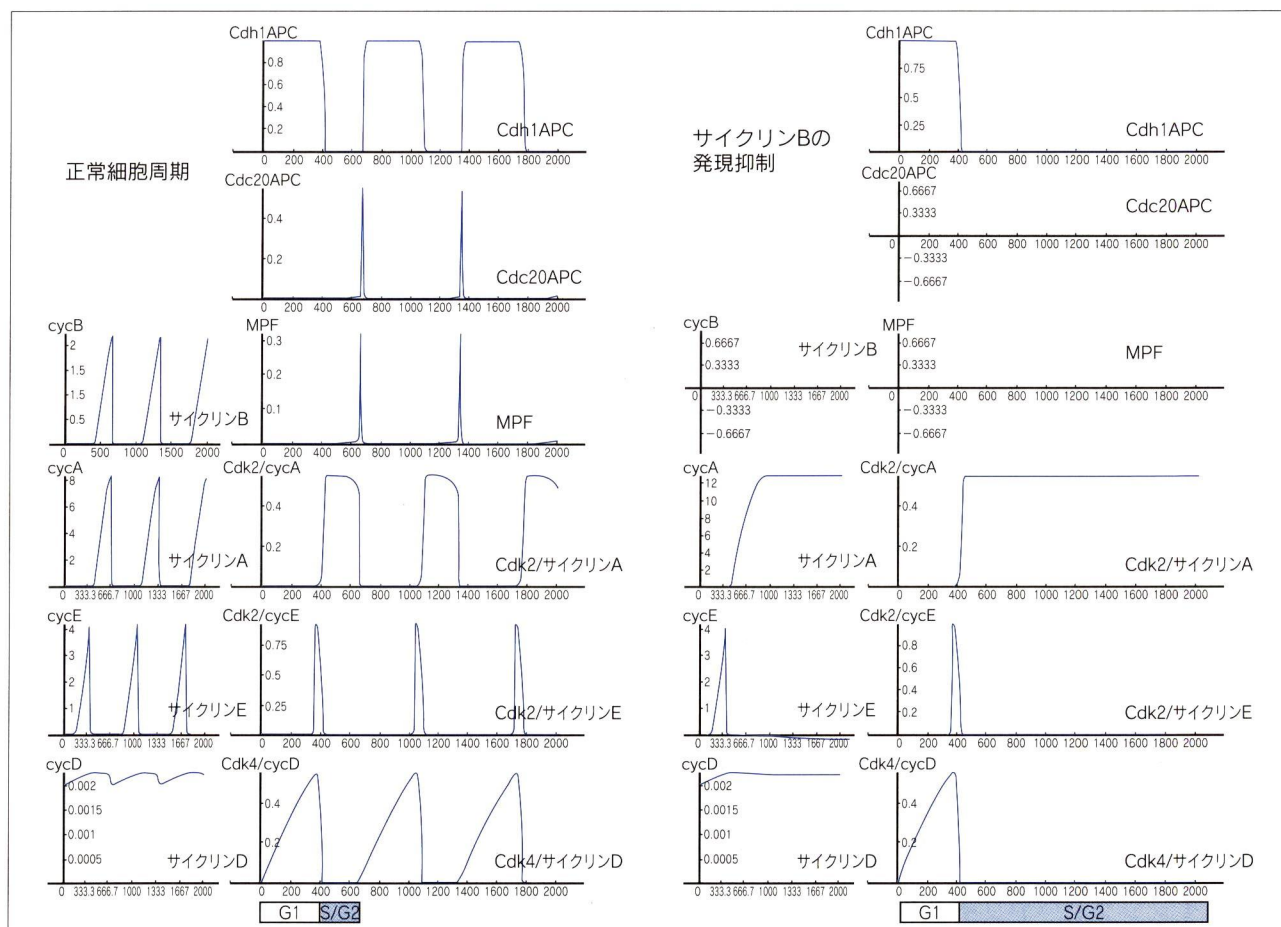


図3 細胞周期ペトリネットによる正常細胞周期とサイクリンBの発現抑制による細胞周期の変化

断片化が起こることがシミュレートされ、実験データと合致する。このモデルでは低濃度のFasリガンドでもミトコンドリアからシトクロムcが放出されているが、その下流のカスパーゼの活性化には至っておらず、アポトーシスのシグナル伝達にはここで閾値が存在していることが推定される。最近、放出されたシトクロムcと結合し、その機能を阻害する物質が推定されており<sup>4)</sup>、非常に興味深い。

カンプトテシンを培養グリオーマ細胞U251に作用させると、サイクリンBの発現低下をきたし、G2遅延を認めたというJanssらの報告<sup>5)</sup>について、筆者らが開発した高等真核生物細胞周期モデル<sup>6)</sup>でシミュレートできるかどうかを検討した。サイクリンBの濃度はmRNAからの翻訳速度を変更することによって調節した。変更前のシミュレーションでは2,000単位時間で細胞周期が3回回転しているが、サイクリンBの低発現によって細胞周期はG2期で停止し、Janssらの報告と同

じ結果になった(図3)。

HPNはわれわれが蛋白質および遺伝子の分子ネットワークを記述する方法と似ているために直観的に理解しやすく、分子の発現制御の相互関係だけでなく、蛋白質の濃度などの量的変化も統一的に記述できる点が有利である。またオブジェクト指向性をもつために、サブシステムごとの記述を最終的に統一することができ、詳しく解析されているところから順に構築することができる。しかし、これまでのデータの大部分は離散値型のものであるため、制御フローに関するパラメータが少ないことが問題となる。

現在、グリア細胞の1つであるアストロサイト全体をシミュレートできる仮想アストロサイトを構築中である。実際の患者でみられる膠芽腫の遺伝子異常が、かなり正確にこのシステムで予測できるようになることを意図している。

表1 インターフェロン $\beta$ 処理によるインターフェロン感受性株(T98G)および抵抗株(U138)の遺伝子発現変化

|                  |          |          |          |         |        |        |
|------------------|----------|----------|----------|---------|--------|--------|
| T98G で発現が亢進した遺伝子 |          |          |          |         |        |        |
| CXCL10           | IFIT1    | IFI27    | MX1      | OAS1    | IRF7   | CXCL11 |
| IRF1             | IL4      | C4A      | HFL1     | CSF1    | HF1    | CD68   |
| C1R              | B2M      | IRF2     | HLA-DRB5 | VAMP5   | TNF    | TRADD  |
| MT1H             | IGFBP4   | TNFRSF6  | ISGF3G   | ITGAM   | IL12A  | IGHG3  |
| CP               | ASS      |          |          |         |        |        |
| T98G で発現が低下した遺伝子 |          |          |          |         |        |        |
| CAT              | APOC1    | MTCYB    | PYGL     | ABCE1   | CLC    | COX7A2 |
| MTCYB            | EEF1A1   | XRCC5    | TPT1     | CTNNB1  | DAD1   | FTH1   |
| RPS16            | RPS6     | RPL9     | ETFDH    | FKBP2   | PFDN4  | RPL32  |
| IFNG             | STMN1    | MME      | EIF2S1   | IFNAR1  | BCL2A1 | CD1A   |
| HHEX             |          |          |          |         |        |        |
| U138 で発現が亢進した遺伝子 |          |          |          |         |        |        |
| IFIT1            | OAS1     | MX1      | CXCL10   | IL4     | IFI27  | CD68   |
| CXCL11           | IRF1     | IRF7     | TNF      | TNFRSF6 | C1R    | HSF2   |
| TGFB1            | RAD23A   | HLA-DRB5 | TGFB2    | TFRC    | TRADD  | CSF1   |
| CTGF             | IL12B    | IL12A    | IRF2     | IRF3    | HFL1   | TBP    |
| VAMP5            | HLA-DQB1 |          |          |         |        |        |
| U138 で発現が低下した遺伝子 |          |          |          |         |        |        |
| EEF1A1           | HSPE1    | RPS6     | EPHX1    | ARHB    | DAD1   | ACTB   |
| VTN              | DNAJB1   | RPL9     |          |         |        |        |

## II. トランスクリプトームとサブシステムの変化

さて、比較的少数のデータの経時的変化を解析するにはI節で述べたシミュレーションの手法が有用であるが、大規模データを全体的に解析し、傾向を探るという研究スタイルには適当ではない。

ポストシークエンス時代となり、癌の研究スタイルは大きく変化してきている。これまでの研究は少数の遺伝子や蛋白質などにターゲットを絞り、その機能異常が細胞や個体に及ぼす影響などを調べる手法が取られてきた。最近では多数の遺伝子変化を一度に検出できるDNAマイクロアレイ法が開発され、大規模な遺伝子発現解析が可能となった。しかし、それから得られるデータは膨大であり、その解析のためいくつかのバイオインフォマティクス[→今月のKey Words(p.794)]ソフトウェアが開発されているが、現時点では各遺伝子の動態を関連づけて説明できるまでには至っていない。

膠芽腫に対して比較的多く用いられている治療法としてIAR(interferon $\beta$ -ACNU-radiotherapy)療法がある。これは放射線照射とアルキル化剤のACNU(*N*'-4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-*N*-(2-chloroethyl)-*N*-nitrosourea)、さらにインターフェロン $\beta$ を

組み合わせて行なう治療法である<sup>7)</sup>。インターフェロンによる抗腫瘍効果は、免疫細胞を介した間接効果と腫瘍細胞への直接効果とが考えられているが、後者の作用機序の詳細については不明であり、感受性を規定する因子もいまだ明らかにされていない。

筆者らはインターフェロンの直接効果の分子機序を検討するために、以下の実験を行なった。数種類のヒトグリオーマ培養細胞にインターフェロンを作用させたところ、T98Gに対しては殺細胞効果が認められたが、U138はインターフェロンに抵抗性を示した。インターフェロン $\beta$ (500 U/ml)作用12時間後のmRNAの発現をインターフェロンチップ(三菱化学BCL社)にて解析した。表1に発現が有意に亢進あるいは低下した遺伝子の上位30位までを遺伝子シンボル名(gene symbol)として示したが、これに基づいてインターフェロンに対する細胞応答の2株間での差異の原因を推定することは困難である。

そこで筆者らはそれぞれの遺伝子の機能をGeneOntology(<http://www.geneontology.org/>)にて分類し、機能を中心としたサブシステムによる分類を行なった(表2)。その結果、インターフェロン感受性のT98G細胞ではG蛋白質共役型受容体とその情報伝達系およびアミノ酸代謝に関するサブシステムが、いずれも機能亢進している可能性が高く、インターフェロン抵抗性のU138

表2 発現変化をきたした遺伝子の GeneOntology による生物学的サブシステム分類

|              |                                                                  |                      |
|--------------|------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 細胞接着         |                                                                  |                      |
| 細胞認識         |                                                                  |                      |
| 細胞間シグナル伝達    | 外部刺激の認知<br>生体刺激に対する応答<br>走性                                      | 防御応答                 |
| シグナル伝達       | 細胞表面結合シグナル伝達<br>細胞間シグナルカスケード<br>2成分シグナル伝達系                       | G 蛋白質共役型受容体蛋白質シグナル経路 |
| 自食作用         |                                                                  |                      |
| 細胞周期         | DNA 複製と染色体周期<br>M 期<br>細胞周期の調節                                   | 細胞周期チェックポイント         |
| 細胞増殖         |                                                                  |                      |
| 細胞運動         |                                                                  |                      |
| 細胞生成         |                                                                  |                      |
| ホメオスタシス      |                                                                  |                      |
| 細胞膜融合        |                                                                  |                      |
| 代謝           | アルコール代謝<br>アルデヒド代謝<br>アミノ代謝<br>アミノ酸およびその誘導体代謝<br>エネルギー経路<br>脂質代謝 |                      |
| 細胞の形状と大きさの調節 |                                                                  |                      |
| ストレス応答       | 害虫/病原体/寄生虫に対する応答                                                 |                      |
| 輸送           |                                                                  |                      |
| 死            | 細胞死<br>セネッセンス<br>組織の死                                            |                      |
| 発生           |                                                                  |                      |
| 生理的作用        | 循環                                                               |                      |
| ウイルスの生活環     |                                                                  |                      |

緑：T98G で亢進しているシステム，青：U138 で亢進しているシステム，黄：両者ともに亢進しているシステム。

細胞ではアポトーシスおよび細胞周期サブシステムが機能亢進している可能性が高いと推定された。インターフェロンにより発現が誘導される免疫応答系のサブシステムは両者とも亢進していた。

21 世紀に入って、癌で中心的な役割を果たしている分子を標的とした画期的な分子標的治療薬が華々しく登場し、いくつかはすでに臨床に応用されている<sup>8)</sup>。これまで有効な治療法がなかった慢性骨髄性白血病、非小細胞肺癌そして転移性乳癌などで試みられ、有効性が確認されている。従来の非特異的治療薬と比べて副作用が少ないとされていた分子標的治療薬であるが、予測外の重篤な副作用が出現したり、殺細胞効果が必ずしも標的分子を介したものである場合とか、実験動物レベルでは強い効果があっても、臨床試験段階でまったく効果がない場合があるなど、問題点も種々指摘されてきている。

これらは標的分子の真の機能の解明が不十分であるのみならず、その分子が属すサブシステムの役割や、他の分子との関連性が解明されていないことによると思われる。

このような現状から脱却するためには、個々の遺伝子の機能だけでなくその遺伝子が働くサブシステムにも関心を寄せることが必要であり、そうすることで癌治療の新たなターゲットが見えてくるものと思われる。近い将来、単一分子を標的とする分子標的治療薬からサブシステムそのものの異常や薬剤に対する反応性の異常などを全体として標的とするサブシステム標的治療薬の開発が重要となるであろう。

## ■ おわりに

癌治療は画一的治療から個々の癌の特性を考慮した個

別化治療(customized therapy)へ、癌細胞を殺す戦略から癌を休眠させる戦略(tumor dormancy)へ、そして遺伝子の異常としての癌の理解(molecular pathology)から、細胞内ネットワークシステムの異常としての癌の理解(system pathology)へ、治療法や概念をパラダイムシフトさせることが重要であると考えられる。そのための重要なツールがシステムバイオロジーである。

実はシステムバイオロジー的思考方法は臨床医にとって違和感は薄い。それはある疾患を治療するにあたり、患者の病歴、血液データ、身体所見、画像所見などを詳しく調べ、それらの分散したデータをシステムとしてまとめ、治療の最終判断をする作業がまさにその思考方法だからである。したがって、システムバイオロジーが成功するか否かは、その原理にあるのではなく、いかに使いやすいツールを開発できるかによると思われる。たいへん魅力的な研究分野ではあるが、今後、理論と膨大なデータとの往復作業を地道に続ける努力が最も必要とされる。

## 文 献

- 1) 松野浩嗣・宮野 悟：蛋白質 核酸 酵素, 47, 2062-2070 (2002)
- 2) 奥川峻史：ベトリネットの基礎, 共立出版 (1995)
- 3) 白石哲也・鈴山堅志・上田茂雄・古田 誠・岡本浩昌・田淵和雄他：ポストシーケンス時代における脳腫瘍の研究と治療(白石・田淵編), p.207-211, 九州大学出版会 (2002)
- 4) Davydov, D. R. : *Trends Biochem. Sci.*, 26, 155-160 (2001)
- 5) Janss, A. J., Maity, A., Tang, C. B., Muschel, R. J., McKenna, W. G., Sutton, L., Phillips, P. C. : *Neuro-oncol.*, 3, 11-21 (2001)
- 6) 小谷秀示・吉岡 隆・小長谷明彦：ソフトウェアバイオロジー, 化学工学会バイオ部会生物情報分野専門分科会 編, 印刷中 (2003)
- 7) Wakabayashi, T., Yoshida, J., Mizuno, M., Kito, A., Sugita, K. : *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, 32, 942-946 (1992)
- 8) 白石哲也・田淵和雄：脳神経外科, 31, 365-381 (2003)

### 白石哲也

略歴：1982年 岡山大学卒業。1990年 UCLA 脳腫瘍研究施設研究員, 2000年 佐賀医科大学脳神経外科講師。研究テーマ：アポトーシス誘導療法, 脳虚血の分子マーカー, 神経幹細胞の成長因子の同定など。抱負：「ねずみを実験で使うなんてかわいそう」という娘の声にこたえるため, 分子ネットワークシミュレーションによるバーチャルマウスをつくりたい。

## ●symposium

### 科学技術振興調整費 「システム生物医学の創成」国際シンポジウム

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 日 時     | 平成 15 年 6 月 25 日 (水) 13:00~18:00                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 場 所     | 東京大学先端科学技術研究センター 4 号館 2 階講堂 (東京都目黒区駒場 4-6-1)                                                                                                                                                                                                                                         |
| プログラム   | はじめに：児玉龍彦, ゲノム・トランスクリプトーム：Hudson, Thomas J. (The Genome Quebec Innovation Centre/Canada) / 油谷浩幸, 癌：野村 仁/Dowdy, Steven F. (UCSD School of Medicine/USA), インフォマティクス：井原茂男/Hill, Colin C. (Gene Network Science, Inc./USA), 膜蛋白質解析技術：浜窪隆雄/先濱俊子, 生活習慣病(代謝・細胞)：柴崎芳一/酒井寿郎, 転写・化学物質：南 敬/野口範子 |
| 参加人数    | 100 名                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 参加費     | 無料                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 申込方法    | 住所・氏名・所属・電話番号を明記し, 下記宛に葉書または FAX, E-mail にてお申し込み下さい。                                                                                                                                                                                                                                 |
| 申込締切    | 定員になり次第                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 申込・問合せ先 | 〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1 #34 東京大学先端科学技術研究センター・システム生物医学ラボラトリー<br>「システム生物医学国際シンポジウム」係<br>Tel. 03-5452-5239 FAX 03-5452-5259 E-mail: lsbm2003@lsbm.org                                                                                                                                  |

<http://www.lsbm.org>