

# 細胞のシステム生物学

理化学研究所  
HPCI計算生命科学推進プログラム  
江口至洋

1. 計算生命科学とは
2. 細胞のシステム生物学
3. 細胞をどうとらえるか
4. 解析例(ネットワーク解析、化学量論解析、反応速度論)

## Take-home messages

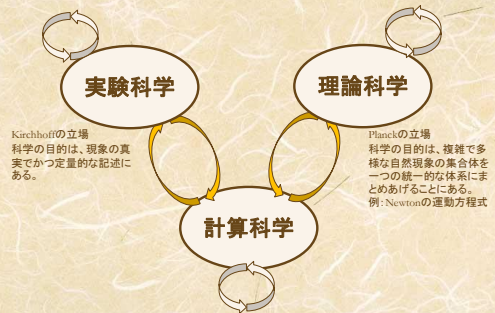
- 1) 生命科学における計測技術の進歩は、計算機の進歩に伴われ、今、新たに**計算生命科学**や**システム生物学**を生み出つつあります。
- 2) システム生物学は**化学反応ネットワーク**を軸に「細胞」を解析します。
- 3) 物理化学法則に則った**数理モデル**を用いて、構造と機能を予測します。

## 1. 計算生命科学とは

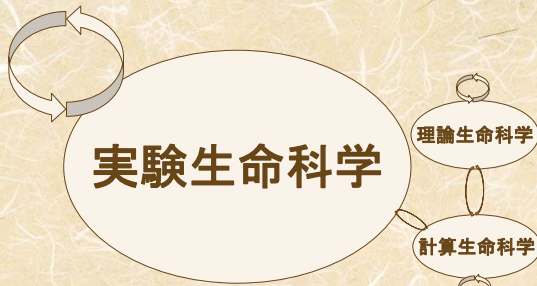
- (1) 3つの科学(実験科学、計算科学、理論科学)の鼎立
- (2) 生命科学における3つの科学の現状と、最近の技術進歩
- (3) 計算生命科学への期待

## 計算科学を媒介にした3つの科学の鼎立

物理学や化学は、比較的3つの科学がバランス良く、鼎立し、発展している。



## 3つの生命科学の「鼎立」状況

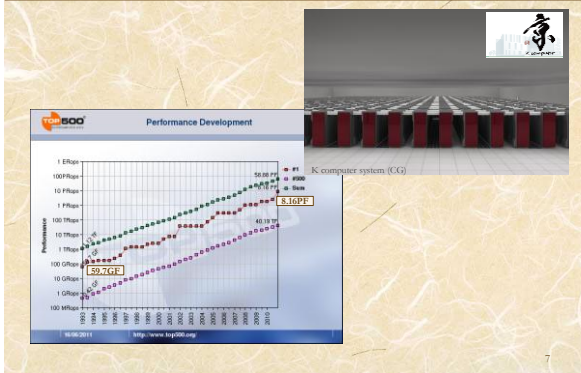


物理学や化学に比べ、生命科学は、その**研究対象の複雑性**もあり、**記述的、データ推進型科学**としての側面が強い。  
ある意味で「歪んだ鼎立」状態にある。

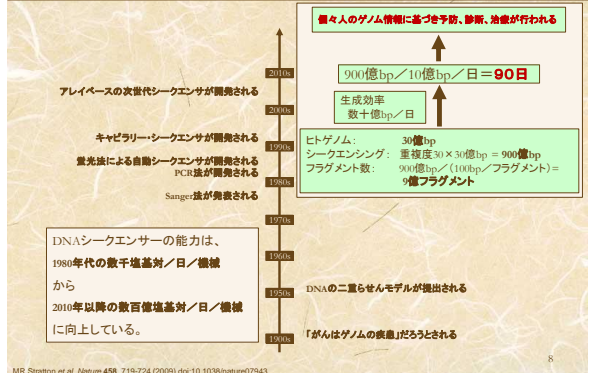
## 生命科学の「鼎立」状況の変化要因(1953~)

- **分子生物学の興隆**
  - さまざまな生命現象に対する理解を分子レベルまで掘り下げていく。
    - ・ Watson「**遺伝子の分子生物学**」→Alberts「**細胞の分子生物学**」
- **計算機科学の進歩**
  - パソコン30台でスパコン(1.5TF)が作れる。(最近のパソコンは理論性能1:2017)
  - 世界トップクラスのスパコンは 8PetaFLOPSにもなる。
- **計測技術の進歩**
  - 一分子計測技術: 動的挙動の解析、反応過程の解析
  - 質量分析装置: タンパク質が飛んだ(1988年) → 一細胞内の分析
  - シークエンサー: 数千bp/日(1980年頃) → 数十億bp/日
  - .....

## 計算科学の飛躍的進歩 —スーパーコンピューター—



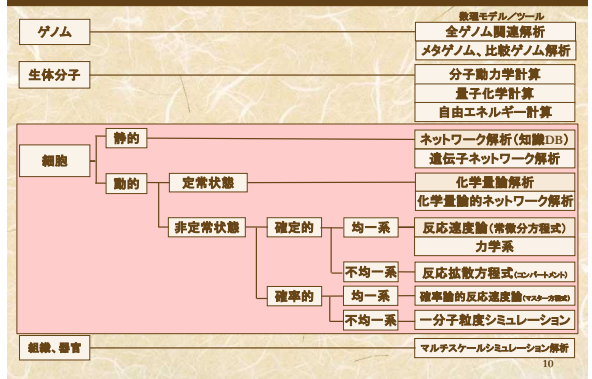
## 計測技術の飛躍的進歩 —次世代シーケンサを例に—



## 計算生命科学を媒介にした3つの生命科学の鼎立



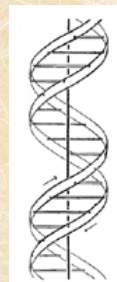
## 計算生命科学の体系



## 2. 細胞のシステム生物学

- (1) システム生物学の背景にある「情報」
- (2) 工学と生物学における「情報」の違い
- (3) 情報の流れはシステムに繋がる
- (4) 生物学、医学、薬学をartからscienceへ

## 1953年WatsonとCrickの主張



われわれが仮定した塩基対は遺伝物質の複製機構を示唆している。

塩基配列は、**遺伝情報を伝達するコード**である。

## 工学における情報

•1948年、Schannon,C.E.による“A Mathematical Theory of Communication” (通信の数学的理論)に始まる。



•受け取ったメッセージに含まれる情報量  $I = \log_2 N \leftarrow I(N \cdot M) = I(N) + I(M)$   
 •工学の主な問題意識は「メッセージを正確または近似的に別の地点に送ること」にある。  
 •その意味内容は問わない。  
 •また伝送路に流れる信号の媒体(横波/縦波、光、電波、...)も問わない。

13

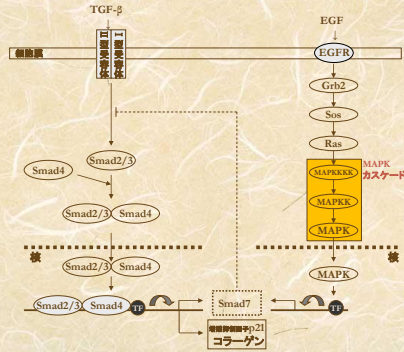
## 生物学における情報

1. 「情報」は分子構造および、その化学変化と密接に結びついている。  
 - 分子は情報を運ぶ!  
 - 情報は分子に乗って!
2. 「情報」の発信-受信の流れは化学反応のネットワーク(パスウェイ)として実現されている。

14

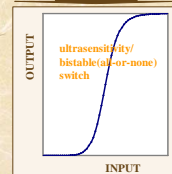
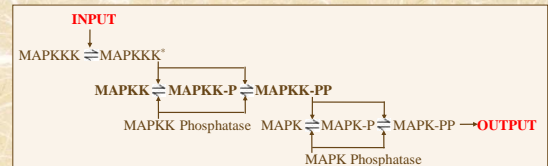
## 情報の流れはシステムに繋がる

—シグナル伝達系とそのクロストークを例に—



15

## 情報の流れはシステムに繋がる



反応機構としての理解

1. 3段階のカスケード継連をとる。(MAPKカスケード)
2. リン酸化の過程は2段階で進む。
3. リン酸化の過程は、processive processではなく、distributive processである。

システムとしての理解

16

## システム生物学の役割: ArtからScienceへ



“If it were not for the great variability among individuals, medicine might have well been a science and not an art”  
 Sir William Osler (1892)  
 The Most Influential Physician in History

But the advent of systems biology has been shifting the equation decidedly toward science.

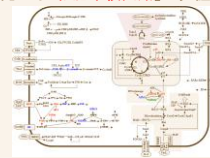
Don Quixote (2000)  
 The Most Constructive Critic in History



17

## システム生物学の役割: ArtからScienceへ

第一段階: 完全な「細胞集積回路」の把握



癌細胞の機能  
 1: 自律的増殖・運動能  
 2: 増殖抑制シグナルへの感受性  
 3: 予防・免疫系抵抗性  
 4: 永続的細胞分裂能  
 5: 血管新生能  
 6: 組織浸透性と転移能

第二段階: 数理モデルの作成と検証

特異的な遺伝子発現による集積回路の変化、組織の細胞機能の変化、そして癌が発生する仕組みを解析する。

第三段階: 合理的な癌の予防と治療法の確立

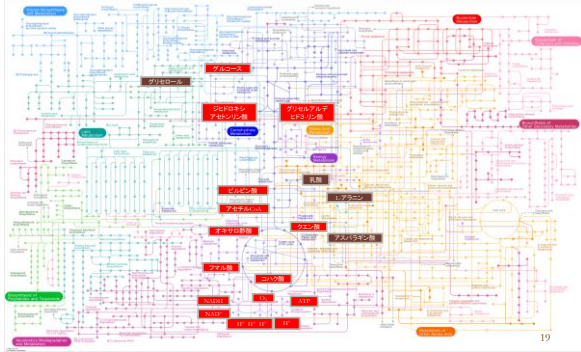
検証された数理モデルによる予測と設計。  
 がん生物学およびがん治療を科学にする。

D.Hanahan & R.A.Weinberg (2000) The hallmarks of cancer,Cell, 100: 57

18

# システム生物学の役割： ArtからScienceへ

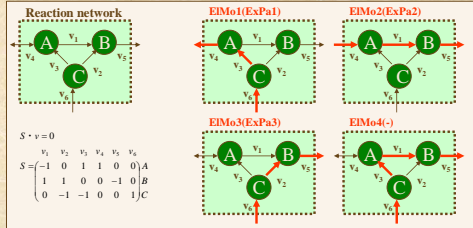
ネットワーク解析がシステム生物学の研究基盤 (KEGGから ©Karchos Laboratories)



# システム生物学の役割： ArtからScienceへ

— 基準モードと極値パスウェイ —

問題意識：  
質量保存則と熱力学的拘束を受けている細胞内の化学反応ネットワークでは、どのような流速分布が実現可能ですか？



## 3. 細胞をどう捉えるか

## 細胞の構成要素の空間的大きさ



## 細胞の構成要素の時間的な広がり

直径15nmほどの物質の核膜孔の通過 (長さ90nmほどのスフィンゴリン核膜孔複合体)

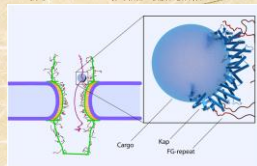


Fig. The cargo complex interacting with FG-repeat domains via hydrophobic patches on the convex surface of the loop-3

Messner-Burg, R. et al. (2011) Brownian Dynamics Simulation of Nucleocytoplasmic Transport: A Coarse-Grained Model for the Functional State of the Nuclear Pore Complex. PLoS Comp Biol., 7(6): e1002049

小さなタンパク質の折り畳み、細胞から出る

within headpiece サブドメイン (1996)

## 細胞の空間的、時間的な構成

	大腸菌	出芽酵母	ヒト細胞
細胞の数	1	1	~10 <sup>14</sup>
種類	1	3	~200
大きさ	~10 <sup>-15</sup> L	~10 <sup>-12</sup> L	~10 <sup>-11</sup> L
細胞内1µmの分子の濃度	~1nM	~1pM	~0.1pM
遺伝子の数	~4,500	~6,600	~25,000
リボソームの数	~10 <sup>6</sup>	~10 <sup>7</sup>	~10 <sup>8</sup>
mRNAの半減期 (中央値)	3~8分 (5分)	3~45分 (20分)	2~20時間 (10時間)
タンパク質の半減期 (中央値)	-	16~128分 (43分)	-
細胞周期の長さ	~20分	~90分	~24時間

- 細胞の機能は、10<sup>-15</sup>から10<sup>-11</sup>リットルという小さな空間で、数千から数万種類の生体分子によって繰り広げられている化学反応に担われている。
- 自己複製、転写、翻訳、代謝、シグナル伝達などからなる生化学反応は、相互に連結し、単一の化学反応ネットワークとして「生きている」機能、すなわち細胞機能を維持している。

## 細胞は物理化学の法則に従って生きている



25

## 数理モデルのもたらすもの

- 大量の生物学、医学、薬学の知識を取り込み、体系化する。(その体系化の枠組みを提供している。)
- 現在の計測技術に依拠しつつも、さらにそれを乗り越えて「自然を見る」ことができる。
- 研究対象の変化(例:正常細胞からがん細胞)に伴う、構造や機能の変化を予測しうる。
- 複雑な生命現象に潜む法則/設計原理を見出しうる。

26

## システム生物学の研究対象である細胞からの挑戦

1. 非線形性の問題
2. 数の問題
3. 不均質性の問題
4. 混雑の問題

27

## 非線形性の問題

—反応速度論—

1850年 L.F.Wilhelmy  
ショ糖の加水分解反応

ショ糖 → グルコース + フルクトース

でショ糖のモル濃度[A]の時間変化が微分方程式

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]$$

で記述されることを示す。(注: 速度定数kの単位)

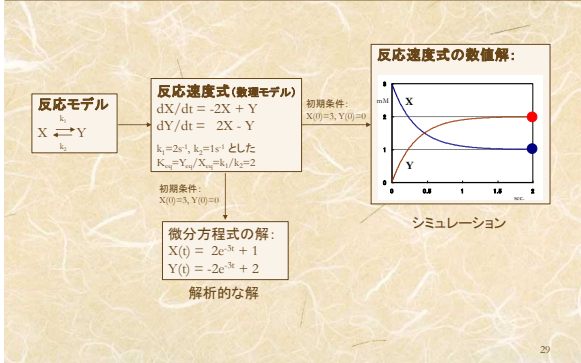
- ① 反応速度は時間に関して一階の微分方程式で記述される。
- ② 反応速度は濃度によって決まり、反応の進行に伴い濃度が変化するため、時間とともに反応速度は変化する。

$$\frac{dc_i}{dt} = f_i(c_1, c_2, \dots, c_n)$$

28

## 非線形性の問題

—線形反応の場合—



29

## 非線形性の問題

—非線形反応の場合(Michaelis-Menten機構)—

- Michaelis-Menten機構



- 反応速度式

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 E \cdot S + k_2 ES$$

$$\frac{dE}{dt} = -k_1 E \cdot S + k_2 ES + k_3 ES$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1 E \cdot S - k_2 ES - k_3 ES$$

$$\frac{dP}{dt} = k_3 ES$$

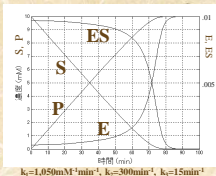
林, 坂本編(1981)「酵素反応のダイナミクス」, 学芸出版センター

30

## 非線形性の問題

—非線形反応の場合(Michaelis-Menten機構)—

### Michaelis-Menten機構



### 定常状態速度式(dES/dt=0)

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dS}{dt} = v = \frac{V_{max}S}{K_m + S}, \quad V_{max} = k_3E, \quad K_m = \frac{k_2 + k_1}{k_1}$$

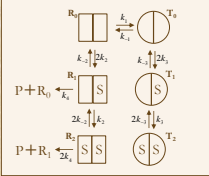
S → P

注: dP/dt = k3Sと近似してはいない。

## 非線形性の問題

—非線形反応の場合(アロステリック酵素)—

Monod-Wyman-Changeuxモデル



定常状態近似式

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}\alpha(1+\alpha)}{L(1+\alpha)^2 + (1+\alpha)}$$

$$L = \frac{k_4}{k_1}, \quad \alpha = \frac{S}{K_d}, \quad c = \frac{K_R}{K_T}, \quad V_{max} = 2k_3E_0, \quad K_R = \frac{k_2}{k_1}, \quad K_T = \frac{k_4}{k_1}$$

Hill関数

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]^h}{K_m^h + [S]^h}$$

## 非線形性がもたらすもの

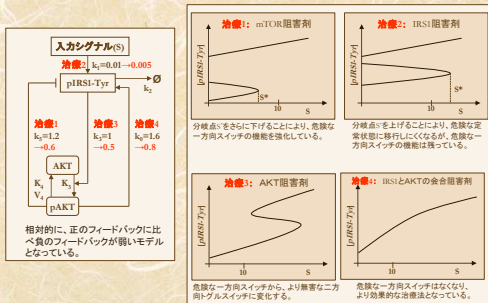
### 線形システムのような見通しの良さが無い

- 数値計算に依存する部分が多い
- 2変数の場合には少しは見通せる
- 線形システムにない構造が形成される
  - 自己組織的な形態の形成
    - 発生、分化における形態形成
  - 自律的な振動解の発生
    - 細胞周期、体内時計
  - 多重定常状態(履歴現象、スイッチ現象等)が現れる
    - アポトーシス

## 非線形性がもたらすもの

—多重定常状態—

—IRS1/AKT/mTORを核にしたインスリンシグナル伝達系—

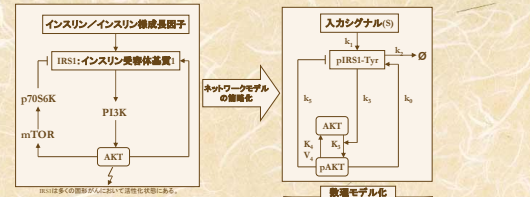


相対的に、正のフィードバックに比べ負のフィードバックが弱いモデルとなっている。

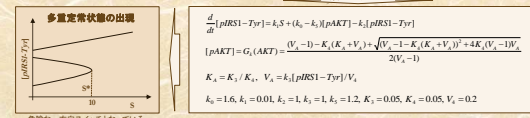
## 非線形性がもたらすもの

—多重定常状態—

—IRS1/AKT/mTORを核にしたインスリンシグナル伝達系—



※ほとんどのパラメータは文献から得られた値から採る。



$$\frac{d}{dt} [pIRS1-Tyr] = k_1 S + (k_2 - k_3) [pAKT] - k_4 [pIRS1-Tyr]$$

$$[pAKT] = G_1(AKT) = \frac{(V_1 - D - K_1(K_2 + V_1)) \sqrt{(V_1 - D - K_1(K_2 + V_1))^2 + 4K_1(V_1 - D)^2}}{2(V_1 - D)}$$

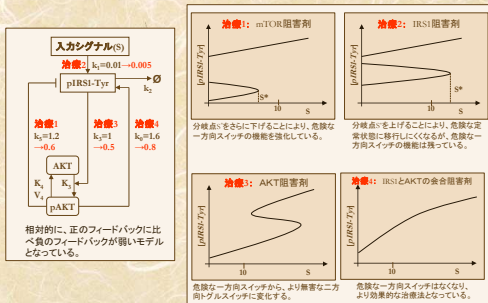
$$K_1 = K_3 / K_4, \quad V_1 = k_1 [pIRS1-Tyr] / V_2$$

$K_1 = 1.6, k_1 = 0.01, k_2 = 1, k_3 = 1.2, K_4 = 0.05, K_3 = 0.05, V_2 = 0.2$

## 非線形性がもたらすもの

—多重定常状態—

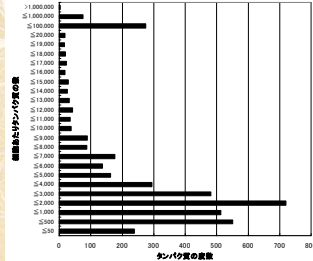
—IRS1/AKT/mTORを核にしたインスリンシグナル伝達系—



相対的に、正のフィードバックに比べ負のフィードバックが弱いモデルとなっている。

## 数の問題

—出芽酵母細胞内のタンパク質数の分布—

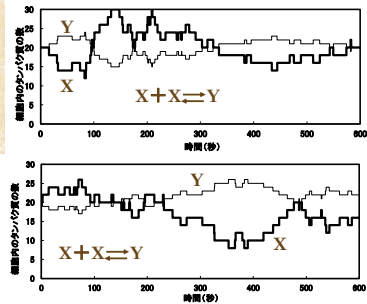


1. 約0.600の遺伝子のうち、4,251種類のタンパク質の発現が確認された。
2. 細胞内の個数は50以下から1,000,000以上まで広いダイナミックレンジを示している。
3. 少ない個数のタンパク質: 転写因子GCN4(50個以下)、ユビキチンリガーゼE3(49個)ホスホリバーゼD(49個)
4. 多い個数のタンパク質: H<sup>+</sup>-ATPアーゼ(1.26 × 10<sup>6</sup>個)アルドラーゼ(1.02 × 10<sup>6</sup>個)

対数増殖機にある一倍体の出芽酵母, *Saccharomyces cerevisiae*の実験での計測結果は50個/細胞であると考えられる。発現は確認されたが、発現数が少なく、個数の計測が不能であったタンパク質の数は図解中の「以下」に含めている。そのため、図中「50」の個数にはこの種のタンパク質が含まれている。

## 数の問題

—会合・解離反応を例に—



時刻*t*に分子*X*と分子*Y*がそれぞれ*x*個存在していたとして、会合・解離反応によるその後の各分子数の変化を計測している。大腸菌の体積を $10^{-14}$ とすると、細胞内の分子*X*の濃度は約3nMにあたる。

37

## 数の問題

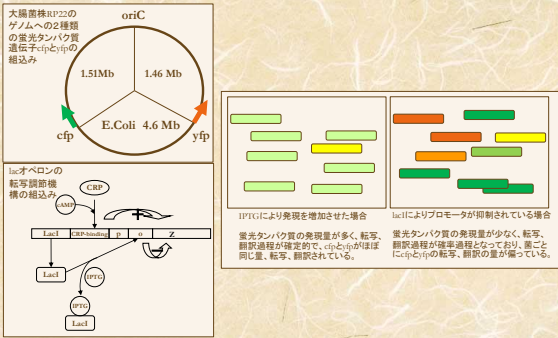
—確率過程としての取り扱い—

- Markov過程を仮定したマスター方程式
  - 時刻 $t_1$ に状態 $x_1$ にあった系が時刻 $t$ に状態 $x_2$ に存在する確率 $P(x_2, t | x_1, t_1)$ について
 
$$\frac{dP(x_2, t | x_1, t_1)}{dt} = \sum_{x_3} (W(x_2 | x_3) P(x_3, t | x_1, t_1) - W(x_3 | x_2) P(x_2, t | x_1, t_1))$$
- Markov過程を仮定した化学マスター方程式
  - 時刻 $t_0$ に*X*分子の数が $x_0$ にあった系が時刻 $t$ になる確率 $P(x, t | x_0, t_0)$ について
 
$$\frac{dP(x, t | x_0, t_0)}{dt} = \sum_i [c_i h_i(x - r_i) P(x - r_i, t | x_0, t_0) - c_i h_i(x) P(x, t | x_0, t_0)]$$
- サンプル過程の計算
  - Gillespieの方法による化学マスター方程式のサンプル過程の計算
  - Langevin方程式による方法
 
$$\frac{dx}{dt} = F_{reaction}(x) + \xi_{reaction}(t)$$

38

## 数の問題がもたらすもの

—細胞にみられる確率過程—



IPYGにより発現を増加させた場合  
蛍光タンパク質の発現量が多く、転写、翻訳過程が確定的で、*cfp*と*yfp*がほぼ同じ量、転写、翻訳されている。

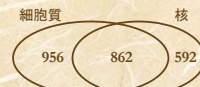
lacIによりプロモータが抑制されている場合  
蛍光タンパク質の発現量が少なく、転写、翻訳過程が確率的となり、同じ遺伝子に*cfp*と*yfp*の転写、翻訳の量が偏っている。

M B Elowitz et al. Science 2002;297:1183-1186

## 不均質性の問題

—出芽酵母におけるタンパク質の細胞内局在—

主な細胞内区画	区画内で同定されたタンパク質の種類
細胞質 cytoplasm	1,818
核 nucleus	1,454
ミトコンドリア mitochondrion	527
小胞体 endoplasmic reticulum	295
核小体 nucleolus	164
小胞 vacuole	163
細胞表面 cell periphery	149

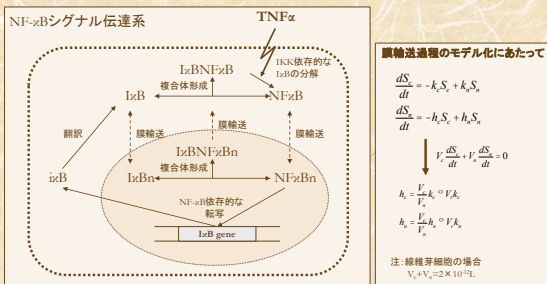


Huh, W.-K. et al (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast, Nature, 425, 686

40

## 不均質性の問題

—NF- $\kappa$ Bのシャットリング—



膜輸送過程のモデル化にあたって

$$\frac{dS_c}{dt} = -k_1 S_c + k_2 S_n$$

$$\frac{dS_n}{dt} = -k_3 S_n + k_4 S_c$$

$$\downarrow \quad \frac{dS_c}{dt} + \frac{dS_n}{dt} = 0$$

$$k_1 = \frac{V_c}{V_n} k_1' \circ V_c k_1'$$

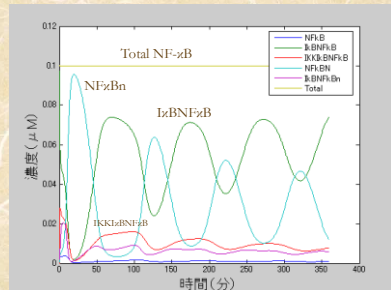
$$k_2 = \frac{V_n}{V_c} k_2' \circ V_n k_2'$$

注: 線維芽細胞の場合  
 $V_c/V_n = 2.8 \times 10^{-1}$

41

## 不均質性の問題

—NF- $\kappa$ Bのシャットリング—



Hoffmann, A. et al (2002) The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: Temporal control and stochastic gene activation, Science, 298, 1241

42

## 不均質性の問題と数の問題への対応

- 不均質性の問題への対応
  - コンパートメント化による取り扱い
  - 反応-拡散方程式による取り扱い
- 数の問題への対応
  - マスター方程式のサンプル過程の計算 (例: Gillespie法)
- 不均質性の問題と数の問題への対応
  - 反応-拡散マスター方程式
  - ブラウン運動のシミュレーション (例: Langevin方程式)
  - 一分子粒度での化学反応シミュレーション (例: Green関数法)

van Zeeh J, van Winkle PR (2005) Simulating biochemical networks at the particle level and in time and space: Green's function reaction dynamics. *Phys Rev Lett*, 94, 124103  
 Takahashi, K. et al. (2010) Spatio-temporal correlations can drastically change the response of a MAPK pathway. *PNAS*, 107, 2437

43

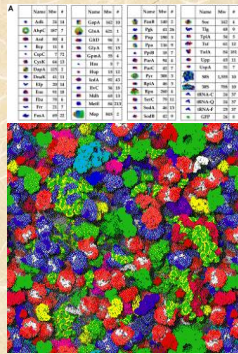
## 混雑の問題

- 細胞内の全空間の20~40%は多種類の生体高分子によって占められている。
- 一つ一つの分子種の濃度は低い (nM~μM) にもかかわらず、生体高分子全体の濃度は高く細胞内は混雑状態になっている。
  - この結果、拡散による移動度は低下し、拡散係数は水溶液中での値に比べ小さな値を示す。
  - また、生体高分子相互は不可入性を示すため、ある生体高分子が細胞内で存在しうる空間が制限され、**排除体積効果** (excluded volume effect) が生じる。
- これら生体高分子の混雑現象は反応速度に複雑な影響を与える。

44

## 混雑の問題

- 大腸菌を研究対象としている
- 細胞内に多く存在する50種類のタンパク質、RNAを選出
  - それらは、Linkららが同定した223種類のタンパク質の内、タンパク質分子の数が85%、重量で86%を占める。
- 一辺80.84nmの立方体に1,008個 (内8個はGFP) の生体高分子を入れ、シミュレーションしている。
  - GFPを除くと、275g/Lとなる。

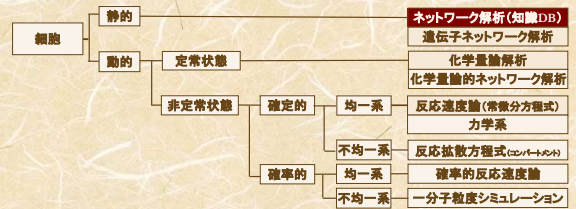


注: 大腸菌の直径は1.000nmほど。

McGuffee SR & Elcock AH (2010) Diffusion, Crowding, & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm. *PLoS Comp Biol*, 6, e1000904

45

## 4.1 ネットワーク解析



Message: ネットワークの視点から実験データを見てみよう!

46

## 疾患感受性遺伝子から疾患感受性ネットワークへ

—全ゲノム関連解析—

- 2002年 Ozakiらによって最初の全ゲノム関連解析がなされた (9万SNPs, 94人の患者と658人の一般人口)
- 2003年 ヒトゲノムの全塩基配列データが公開された
- 2005年 HapMap 1: 4つの集団の269人, 100万個以上のSNPが解析、公開された
- 2007年 HapMap 2: 同じ269人, ほぼ210万個のSNPが追加された
- 2010年 HapMap 3: 世界の11の集団に由来する1,184人, 約160万個のSNPの遺伝子型が決定された

HapMapプロジェクトの成果  
患者、健康人の管理されたサンプル  
Typing: 技術の進歩 (数十万のSNPチップ)

### 全ゲノム関連解析 (GWAS: Genome-wide association study)

サンプル数: 患者 (case)、健康人 (control) それぞれ数千人から数万人  
SNP数: 数十万から数百万

SNPなど候補となった遺伝的変異の  
機能解析

疾患感受性遺伝子の同定、疾患感受性ネットワークの同定による予防、診断、治療の進歩

Ozaki, K. et al. (2002) Functional SNPs in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 32, 650-4

47

## 疾患感受性遺伝子から疾患感受性ネットワークへ

—全ゲノム関連解析—

下記Natureの論文とN Engl J Medの論文から全ゲノム関連解析の結果であるManhattan Plotを大学院生には示し、説明した。このスライドでは省いているため、下に示す原論文を参照願いたい。

the Wellcome Trust Case Control Consortium (2007)  
Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,900 shared controls. *Nature*, 447, 661

7つの疾患ごとに~2,000人の患者。  
~3,000人の健康人。  
全体で17,000人について各50万SNPをタイピング。

・値が低いSNPは候補遺伝子と考えられる。  
・値が低いSNPに近接する遺伝子は疾患感受性遺伝子と考えられる。  
・値が低いSNPに近接する遺伝子は薬物ターゲットになる可能性が高い。

Pfege, R.M. et al. (2007) TRAF1-C5 as a Risk Locus for Rheumatoid Arthritis - A Genome-wide study. *NEJM*, 357, 1199

1,522人のリウマチ患者。1,850人の健康人。約30万SNPをタイピング。

48

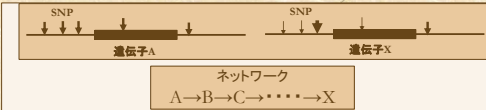


## 疾患感受性遺伝子から疾患感受性ネットワークへ —単点解析の問題—

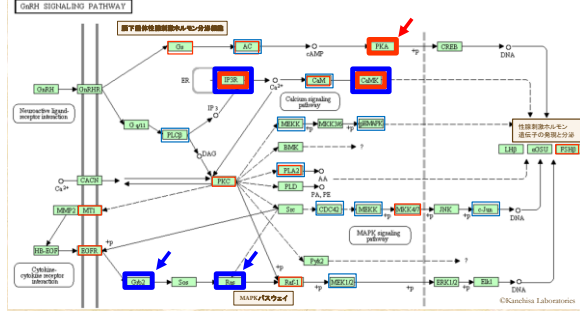
複数の遺伝子が集団として重要な役割を果たす場合、個々のSNPが抜け落ちてしまう危険がある。  
患者／健康人集団や解析方法の違いによって、抽出されるSNPが異なる。

ネットワークからの視点

SNP位置ではなく、疾患感受性遺伝子さらには疾患感受性ネットワークを探索する。

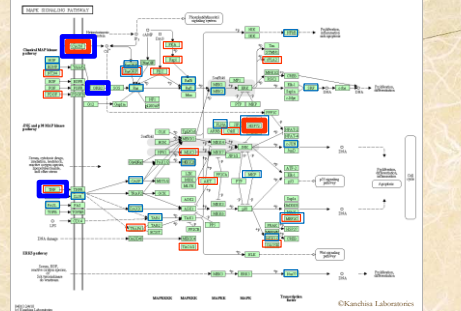


## 疾患感受性ネットワークの探索(例:リウマチ)



英国を対象にしたWTCCCのデータ: **rs2231142** **rs2231143** **rs2231144**  
北米とスウェーデンを対象としたPlengeらのデータ: **rs2231142** **rs2231143** **rs2231144**  
(KEGGのマップを使用) *Plenge P. et al (2010) Gene and pathway-based second-variant analysis of genome-wide association studies. Eur J Hum Genet, 18, 111*

## 疾患感受性ネットワークの探索(例:リウマチ)



英国を対象にしたWTCCCのデータ: **rs2231142** **rs2231143** **rs2231144**  
北米とスウェーデンを対象としたPlengeらのデータ: **rs2231142** **rs2231143** **rs2231144**  
(KEGGのマップを使用) *Lau J. et al (2010) Genome-wide gene and pathway analysis. Eur J Hum Genet, 18, 1045*

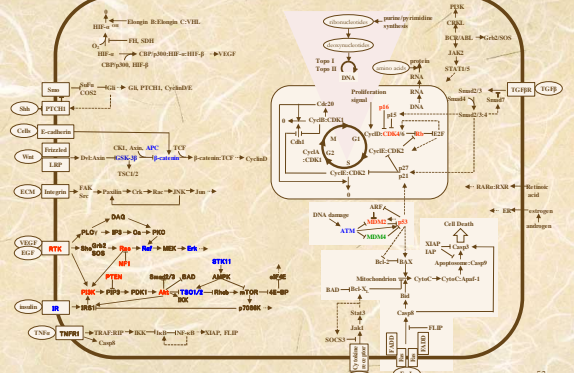
## がんのパスウェイ解析

- **グリア芽細胞腫 glioblastoma の研究**
  - 91人のグリア芽細胞腫でゲノム上の**601個**の遺伝子領域をシーケンシング。206人のグリア芽細胞腫でコピー数変異、遺伝子発現量変異、DNAメチル化を計測。
  - シーケンシングは97百万塩基対におよぶ。
- **肺腺がん lung adenocarcinoma の研究**
  - 188人の患者の肺腺がん遺伝子を解析。
  - ゲノム上の**623個**の遺伝子領域をシーケンシング。
  - 1,000以上の体細胞突然変異を見出す。内26遺伝子が高頻度に生じている。

典型的には、数百人のがん細胞の数百遺伝子を対象に、数億塩基対のシーケンシングを行っている。  
個々のがん患者についてみると、5から20個のがん遺伝子に変異がみられている。

TCGA Research Network(2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature, 455, 1061  
Ding L. et al (2008) Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature, 455, 1069

## がんのパスウェイ解析と効果的な治療法—がん遺伝子—



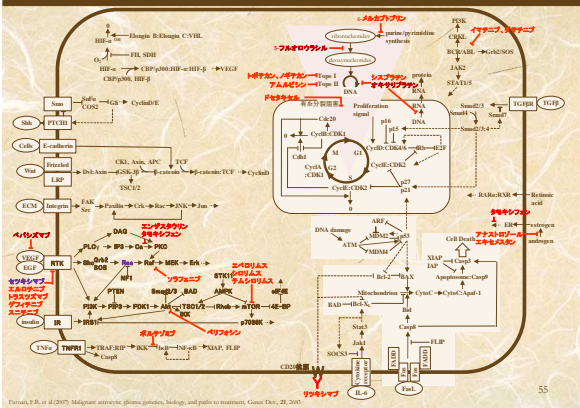
TCGA Research Network(2008) Nature, 455, 1061 : glioblastoma (多形性グリア芽細胞腫)  
Ding L. et al (2008) Nature, 455, 1069 : lung adenocarcinoma (肺腺がん)  
Cancer = lung adenocarcinoma + glioblastoma

## がんのパスウェイ解析と効果的な治療法

- **グリア芽細胞腫 glioblastoma の研究から**
  - 解析した腫瘍の大部分はTP53(P53), MDM2, MDM3), RB(RB), CDK4, p16), PI3K(PTEN, PIK3, IRS1)パスウェイ上の遺伝子で変異がみられた。
  - 同一パスウェイ上で複数の遺伝子に変異がみられる腫瘍は一つの例のみであった。→同一パスウェイ上の個々の遺伝子は、腫瘍形成において機能的に同一の機能を果たしている。
- **肺腺がん lung adenocarcinoma の研究から**
  - 個々の患者で変異している遺伝子を解析し、当該遺伝子が構成するパスウェイを阻害する抗がん剤の投与といった新たな治療方針を考える必要がある。

TCGA Research Network(2008) Nature, 455, 1061  
Ding L. et al (2008) Nature, 455, 1069

がんのパスウェイ解析と効果的な治療法—抗がん剤の作用点—



Tomoda, S. et al. (2007) Molecular structure, photosynthesis, biology, and path to treatment. *Genes Dev.*, 21, 200.

分子標的からネットワーク標的へ—抗うつ薬—

**抗うつ薬開発の歴史:**

**1950年代 セレニディピティの勝利**  
 精神治療薬イブロンアジドと統合失調症治療薬イミプラミンに抗うつ作用があることが偶然発見される。

**1960年代 創薬パラダイムとしてのモノアミン仮説**  
 イミプラミンはじめ三環系抗うつ薬はモノアミントランスポートを阻害する。イブロンアジドは主要なモノアミン分解酵素であるMAO (monoamine oxidase)を抑制する。  
 ⇒モノアミン仮説「シナプス間隙におけるモノアミン(特にセロトニン、ノルエピネフリン)濃度の上昇により抗うつ作用が発揮される」

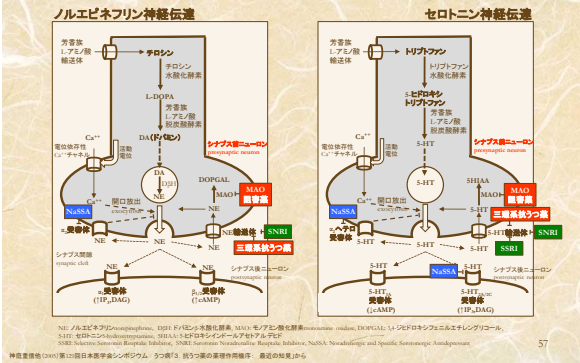
**1980年代 選択的セロトニン再取り込み阻害薬**  
 (SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitor)の開発  
**セロトニン・ノルエピネフリン再取り込み阻害薬**  
 (SNRI: Serotonin/Norepinephrine Reuptake Inhibitor)の開発

**1990年代 ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬**  
 (NaSSA: Noreadrenergic and Specific Serotonergic Antidepressant)の開発

**2000年代 神経可塑性仮説**

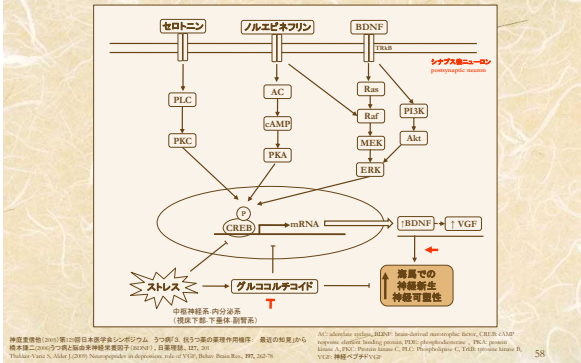
56

分子標的からネットワーク標的へ—抗うつ薬—



57

分子標的からネットワーク標的へ—抗うつ薬—



58

分子標的からネットワーク標的へ—アラキドン酸代謝ネットワークと抗炎症薬—

**伝承の時代**  
 BC400年 ヤナギの樹皮からの抽出エキスは鎮痛・解熱のために用いられていた。

**創薬の時代(アスピリンの時代)**  
 1763年 ヤナギ樹皮からの抽出物(サリチル酸)を解熱薬として使用する。  
 1899年 アスピリン(非ステロイド性抗炎症薬)がBayer社によって発売される。

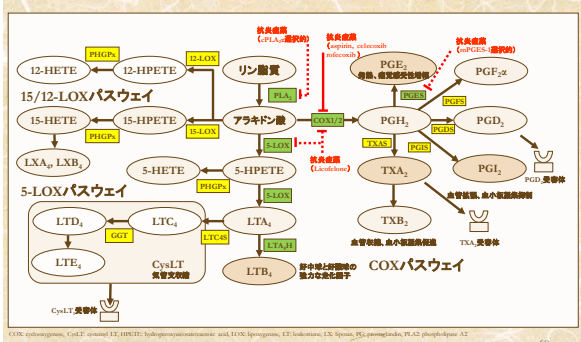
**ターゲット探索の時代**  
 1971年 アスピリンがプロスタグランジンの生合成を抑制するという研究結果がでる。(アスピリンはCOX-1とともに、COX-2をも阻害するため、胃結腸などの障害が避けられないとされた。)

**COX-2の時代(新しい創薬パラダイム)**  
 1990年代 選択的COX-2阻害剤の開発  
 ⇒COX-2選択的阻害剤の開発  
 1999年 FDAが、Merck社のVioxx(rofecoxib)を承認。

**ポストCOX-2の時代**  
 2004.9.30 FDAはMerck社Vioxxの自主回収を承認した。2000年に始められた臨床試験において、重篤な血栓性事象の発現率が、プラセボに比べる倍程度であった。発現率の差は18ヶ月の治療期間後に始めて観察された。

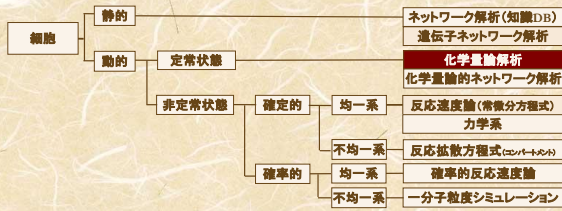
59

分子標的からネットワーク標的へ—アラキドン酸代謝ネットワークと抗炎症薬—



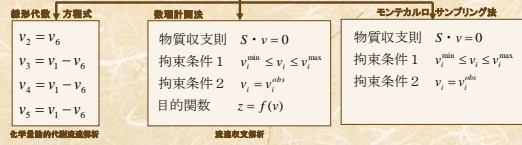
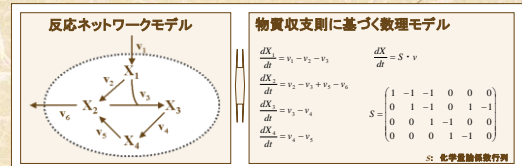
60

## 4.2 化学量論解析



Message: 細胞機能は、温度ではなく、定常状態下での反応速度(流速)に規定されている!

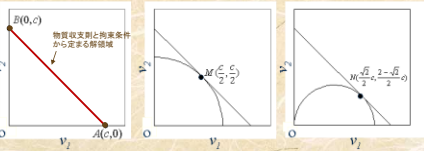
## 化学量論解析



## 流速収支解析のモデル



- a) ATPあるいはNADHの生成速度最大  $\max(v_1)$  or  $\max(v_2)$
- b) 内部流速ベクトルの二乗和最小  $\min(v_1^2 + v_2^2)$
- c) 流速当たりのATP生成速度最大  $\max(v_1/(v_1^2 + v_2^2))$



## ニューロンとアストロサイトのエネルギー代謝連関

**ニューロン(神経細胞)**  
刺激を受け、活動電位を伝える。  
例: グルタミン酸作動性ニューロン、コリン作動性ニューロン、GABA作動性ニューロン

**中枢神経系のグリア細胞**

**アストロサイト**  
①ミクログリアを含み、神経細胞を支持している。  
②血液中の有害となる物質から神経細胞を隔離している。(血脳関門)  
③神経細胞の活動電位を発生させるための化学環境を維持している。

**オリゴデンドロサイト**  
髄鞘(ミエリン鞘)の形成、維持を担う。

**シクログリア**  
食細胞として機能している。

**上衣細胞**  
脳脊髄液の循環を作り出している。

**末梢神経系のグリア細胞**

**シュワン細胞**  
髄鞘を形成化する。神経差因子を分泌するとともに、ラミニンやコラーゲンからなる基底膜を作って神経路の足場を確保することで、再生軸索の伸長を助ける。

**衛星細胞**  
構造的な支持とともに、神経細胞体と関連物質の物質交換を制御している。

ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、シクログリアのイラスト図を示して、大学院生に説明した。原図は下記Natureを参照願いたい。

<http://www.nature.com/nature/journal/447/7129/images/447129a-f1-2.jpg>

## エネルギー代謝連関の流速収支解析

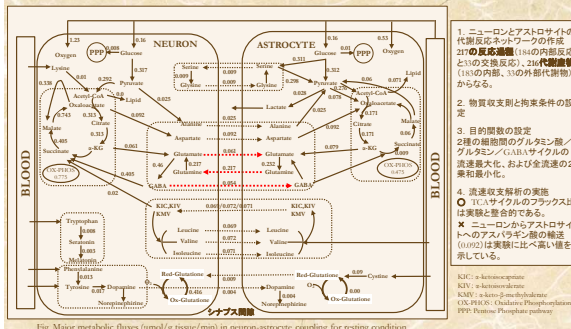


Fig. Major metabolic fluxes (μmol/g tissue/min) in neuron-astrocyte coupling for resting condition

1. ニューロンとアストロサイトの代謝反応ネットワークの作成  
210の反応速度(140の作動反応と70の交換反応)、21の代謝産物(18の内部、33の外部代謝物)からなる。
2. 物質収支則と拘束条件の設定  
3種の細胞間のグルタミン酸/グルタミン/GABAサイクルの流速最大化、および全流速の2乗和最小化。
3. 目的関数の設定  
2種の細胞間のグルタミン酸/グルタミン/GABAサイクルの流速最大化、および全流速の2乗和最小化。
4. 流速収支解析の実施  
○ TCAサイクルのフラックス比は実験と整合的である。  
× ニューロンからアストロサイトへのアスラワン類の輸送(0.02)は実験に比べ高い値を示している。

KIC: α-ketoglutarate  
KIV: α-ketobutyrate  
KIV: α-keto-β-methylcrotonate  
OX: OXPHOS (Oxidative Phosphorylation)  
PPP: Pentose Phosphate pathway

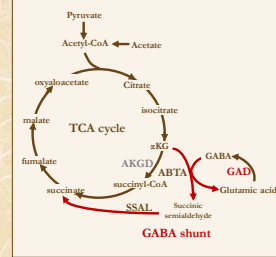
## 細胞特異的な代謝表現型の変化

**アストロサイトと3種類のニューロンのモデルを作成**  
それぞれ約1,000の反応、約1,000の代謝産物を含む。

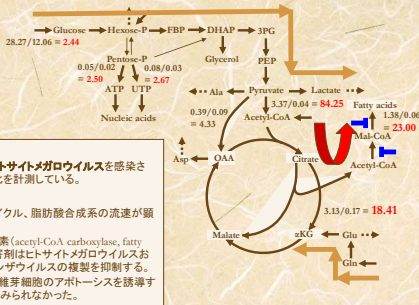
**Alzheimer病に伴う神経毒性を解析**  
中程度のAlzheimer病患者では、グルタミン酸作動性ニューロンやコリン作動性ニューロンは、GABA作動性ニューロンに比べより大きな障害を受けている。

**解析方法はモンテカルロサンプリングを用いた流速収支解析**  
シケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(AKGD)の酵素活性が阻害された場合、3種類のニューロンの代謝パスウェイの流速の実験を予測した。  
グルタミン酸作動性ニューロンやコリン作動性ニューロンではGABA側面の流速は低い状態を維持したままであったが、GABA作動性ニューロンでは高い状態に変化した。  
その理由は、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)がGABA作動性ニューロンで高い発現を維持していることにある。

**モンテカルロサンプリングの結果を示して、大学院生に説明した。原図は下記論文を参照願いたい。**



### 代謝流速プロファイリングによる抗ウイルス薬ターゲットの同定



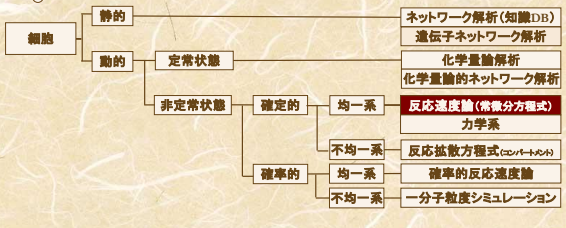
**実験:**  
ヒト繊維芽細胞にヒトサイトメガロウイルスを感染させ、代謝流速の変化を計測している。

**結果:**  
1) 解糖系、TCAサイクル、脂肪酸合成系の流速が顕著に増加している。  
2) 脂肪酸合成系酵素 (acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase) の阻害剤はヒトサイトメガロウイルスおよびA型インフルエンザウイルスの複製を抑制する。  
3) 当該阻害剤は繊維芽細胞のアポトーシスを誘導することはなく、毒性もみられなかった。

HCMV-infected / uninfected cells  
Unit: nmol/min/1.5\*10<sup>6</sup> cells

Mingos, J. et al. (2006) Dynamics of the cellular metabolism during human cytomegalovirus infection, PLoS Pathogens, 2, e132  
Mingos, J. et al. (2008) System-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy, Nature Biotech, 26, 1179

### 4.3 反応速度論



Message: 感度解析は化学反応ネットワークの頑健性と脆弱性を明らかにする!

### 感度解析の背景

**システム (例: 細胞) の数理モデル化**  
 数理モデル  $\frac{dX}{dt} = f(X, p, I)$   
 初期条件  $X(t_0) = X_0$   
 拘束条件  $g(X) \in \text{Constraint}$

外乱 (p, I) により目的関数はどう変化する?  
 目的関数  $Obf(X)$   
 系への外乱  $\delta p$  (e.g.  $\delta X_0, \delta p$ )  
 評価関数  $\frac{\partial Obf(X)}{\partial p}$

**ホメオスタシス** (1929年 W.B.Cannon)  
 生物が外界との相互疎遠を行いながら、自己の内部環境をほぼ一定に保つ現象

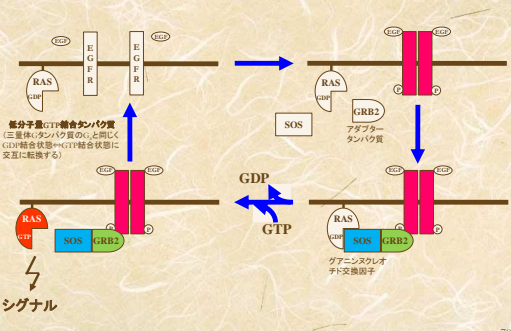
**キャナライゼーション** (1942年 Waddington)  
 環境の変化にかかわらず必然的に定められた一定の発生、分化の道筋 (クレオド) を進むようとする傾向

**構造安定性** (1972年 R.Tom)  
 関数を少し変化させても動的挙動に大きな変化が生じない系の性質

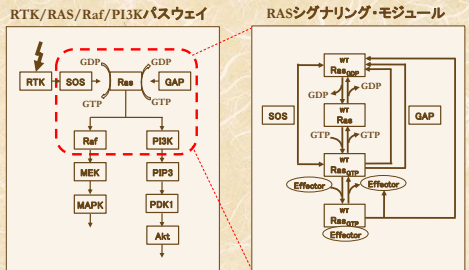
**ロバストネス** (~2004年 Kitano, Stelling, ...)  
 外乱に対して生命機能を維持する能力

**システムの脆弱部位の探索**  
 (e.g. がん細胞への創薬ターゲットの探索)

### モデル化の例 -EGFR/Rasシグナル伝達系-



### RASシグナリング・モジュールにおける創薬ターゲットの探索

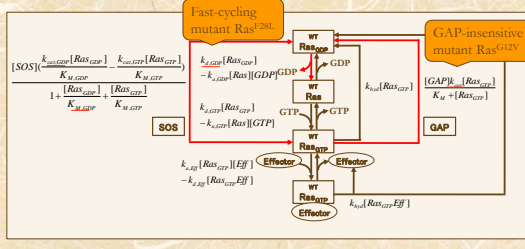


注1) GAP: GTPase-促進タンパク質 (例, NF1), Effector (例, Raf)

Stiles, E.C. et al. (2007) Network Analysis of Oncogenic Ras Activation in Cancer, Science, 318, 463

### RASシグナリング・モジュールの数理モデル化と感度解析

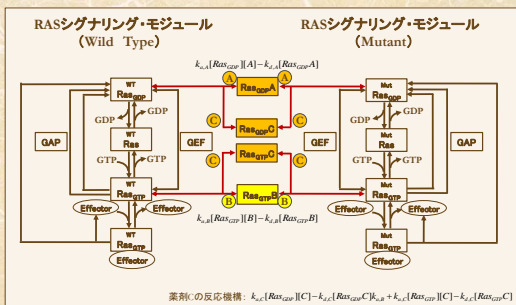
RASの活性化は、主に4つの因子によって影響を受けている。その他の因子の変動にはロバストである。



注1) GAP: GTPase-促進タンパク質 (例, NF1), Effector (例, Raf)  
 注2) 感度解析では、複合体  $Ras_{GTP} \cdot SOS$ 、Effector の定常状態濃度の変化を評価している。

Stiles, E.C. et al. (2007) Network Analysis of Oncogenic Ras Activation in Cancer, Science, 318, 463

## RASシグナリング・モジュールにおける 創薬ターゲットの探索



注1) 各薬剂は野生型、変異型、どちらにも同じ速度定数で余命、解離する。  
 注2) 薬剂( )は、野生型 $Ras_{GTP} + Effector \rightarrow Ras_{GTP} \cdot Effector$ の形成をより強く阻害する。薬剂( )は、野生型での形成をより阻害する。

Shay, J.C. et al (2007) Network Analysis of Oncogenic Ras Activation in Cancer, Science, 318, 463

