

癌治癒の分子基盤： 驚異的ゲノム柔軟性と 遺伝子機能回復

Drastic genomic alterations in a human transcriptome and transcription factor control identified in the course of cancer recovery by Huaier administration.



株式会社ブラディオンの医学研究所

田中 真奈実
田中 朝雄

〒259-1211 神奈川県平塚市ふじみ野2-22-9 TEL & FAX: 0463-58-0952
ホームページ: <http://www.bradeion.com/wp/>
E-mail: manami-tanaka@bradeion.com tubu0125@gmail.com

はじめに

本稿で紹介する全RNAシーケンスは、最近、次世代マーカー検査として、患者様の個人情報網羅に適用され始めた。主な用途は、抗癌剤選択の一助として、あるいは、薬剤反応性予測のためとされている。しかし、この測定法の実効性は、治療の効果判定にあることをここに示したいというのが本稿の目的である。技法そのものは目新しくないが、解析データの表現法にはなじみのない方も多くと推測する。ぜひ、これからの癌のみならず難治性疾患の治療指標として、パターン認識に慣れていただければ幸いである。

近年では、代替医療、補助療法を併用している癌患者が半数以上とこのことであるが、2017年秋号(Vo. 7)¹⁾にて、槐耳(英名: Huaier、*Trametes robiniophila murr*)²⁾を用いた癌補完療法につき紹介させていただいた。槐耳効果の分子基盤は、細胞の刺激伝達系制御のかなめとなる、Hippo Signaling Pathway修復能によるという仮説の実証を示したが³⁾、今回は、引き続いて、癌治癒過程で惹起される生体反応の分子機序の詳細を紹介する⁴⁾。

ここで、抗癌剤の実際を顧みるに、既に2014年、チューリヒ開催の米国・欧州癌学会主催、癌治療シンポジウムにおいて、抗癌剤および新薬開発の限界が詳細な過去データの解析を基に論じられていた。いわく、開発プロジェクト発足の事前準備に2~4年もかかること、予備実験中に得られたデータの再現性が低い(65%)、薬剤認可まで平均9年もかかるのにPhase IIの成功率が18%、薬剤会社としては、新規創薬にかかるリスクを除外するか、あるいは、経費を半額以下で済むものにするかの

選択を迫られる、という結論であった。

しかも、抗癌剤に求められる要件は、現実問題として、効力が半分、対策戦略としての論理的基盤が3割、薬剤安全性は2割程度しか考慮されない。興味深いことに、抗癌剤候補においては抗癌効果より、生体の代謝機能調節(回復?)に多くの効能が認められたとある。抗癌という性質と、代謝促進進行して観察されるのかと驚いて記憶した次第である。

創薬企業群としての、究極の意見は、患者は医師に意志決定権をまかせるな、医師の診断は、薬が効けばその対象疾患と同定できる程度、と考えればよろしい、治ればいいのだ、治れば、...とノートにあり、当時も今も驚愕している。

癌化プロセスは、10年余の年月をかけて遺伝子異常、ひいては細胞の機能異常が集積していくものであるが、今回、我々の臨床研究にて明らかになったことは、治癒過程においては、1ヶ月単位でゲノム全般の変異と半数以上構造遺伝子群の質・量ともに大規模な機能修正が行われているということである²⁾。行きは鈍行、帰りはスペースシャトル。しかも、修正すべき因子は、一つや二つや百や二百ではない。つまりは、この効果をもたらすためには、一重に患者自身の、体内の変化に耐える力があるかどうか、が重要なのである。年齢、性別、癌種に有意な差はない。あくまで診断時の進行度合、手術が可能かどうか、食欲含めて体力がどの程度温存されているか、に尽きる。

現状の最善の癌対策は、1)可能な限り癌組織の体外除去、2)化学療法は効力より毒性と副作用重視、そして3)患者の体力維持・代謝機能改善、であることは言わずもがなである。効力があって毒性がない場合も、最終的に予後を決めるのは患者体内の治癒に耐えるエネルギーである。

今回は、槐耳がもたらすゲノムワイドな劇的変異効果につ

き、紹介する。確かに、治れば良いというのは真実である。しかし、根拠がなくて、結果は得られないという典型例の紹介である。

臨床研究デザイン

2017年秋より計画した臨床研究および関連共同研究は、順調に経過しており、予定数を増やし、内容も癌対策のみならず癌予防も含め、継続中である(40名の定員に対し、現在も募集中)。中国国内においては、肝臓癌、食道癌で同様の臨床研究が施行されており、全RNAシーケンスの結果を受けて、新たな抗癌剤ターゲット群の列挙も相次いで報告されている⁵⁻⁷⁾。また、WHOにて、槐耳の乳癌を対象とした臨床治験(2万人規模)も開始されている。

我々の臨床研究においては、40代-80代までの癌と診断された患者に槐耳1日20gを90日間服用していただき、服用前・4週間後・90日後の3回の全血サンプルよりRNA抽出、全RNA解析およびsmall RNA (non-coding region 含む)解析を行い、臨床病態の変化と遺伝子変化があれば何でも、その相関関係を知ろう、というものである。

概ね7.0GB以上のシーケンスであるため、全ゲノムカバーというには少々足りないが、全構造遺伝子解析には十分以上のスケールである。ゲノムマッピング率は平均75%、約38,000のtranscriptsを検知、うち27,000程度が既知のもの(ただし、RNA editingによる未知スプライシング内容を含む)、6,000余の新規遺伝子を発見、残りは、長鎖 noncoding RNAであった。Transcriptomeの検出率はほぼ100%である。

当初、予想された遺伝子・刺激伝達経路への影響程度の遺伝子変異検出をはるかに凌駕し、槐耳服用後のゲノム変異が質量ともにあまりにも大きかったため、研究途中でどうしても何らかのコントロールの必要性を痛感し、70歳前後で、男女ともに、1)何らかの疾病として診断されるものがない、さらに重要な

は、2)常用薬剤の服用が一切無い、というボランティア様に協力いただき、一応のコントロールとした。結果が先になるが、槐耳服用しても、しなくても、特に疾病のない方々には、以下に記すゲノム変異、遺伝子変異は検知されなかった。

1 2万ではなく、12万!!! : RNA editing

始めに、サンプル採取から全自動機器にセットするまでがひとのなせる業、その先は最先端機械が図の作成まで完遂するので、人間の手が入らないことを強調しておく。データベースの選択(数)、データの解釈についてはひとのなせる業であるが、実際の解析作業、図の作成については、人の手を経たものは何一つない。

まず、RNA→mRNAに至るまでの工程で、すでに驚異的事象が検知された。最初の工程は、1)sequencing to 2) reads filtering, 3) genome mapping, 4) novel transcripts prediction, 5) SNP and INDEL variant detection, and 6) differentially splicing gene detection, となり、以後やっとなじみ深い遺伝子発現制御とその結果に至るのである。それ以前に既に病態変化、癌からの治癒工程は始まっていたのであった。

槐耳投与4週間で各個人より見地されたSNP variantを図1aに示す。比較として、2012年に発表されたRNAシーケンス解析情報に基づけば、正常の漢民族(中国)男性において、RNA editing発生総数は、一人につき22,688、最も多いediting内容はA→G(I)である⁸⁾。しかるに、当該臨床研究において得られたデータでは、発生総数が74,311~131,609、桁が違っているのである。その内容は、A→G(I)、C→Tがほぼ同率で4万回、次にA→C、A→T、C→G(I)、G(I)→Tが各々1万程度であり、正常で検知できる内容とはほど遠い数値と内容であった。この変異

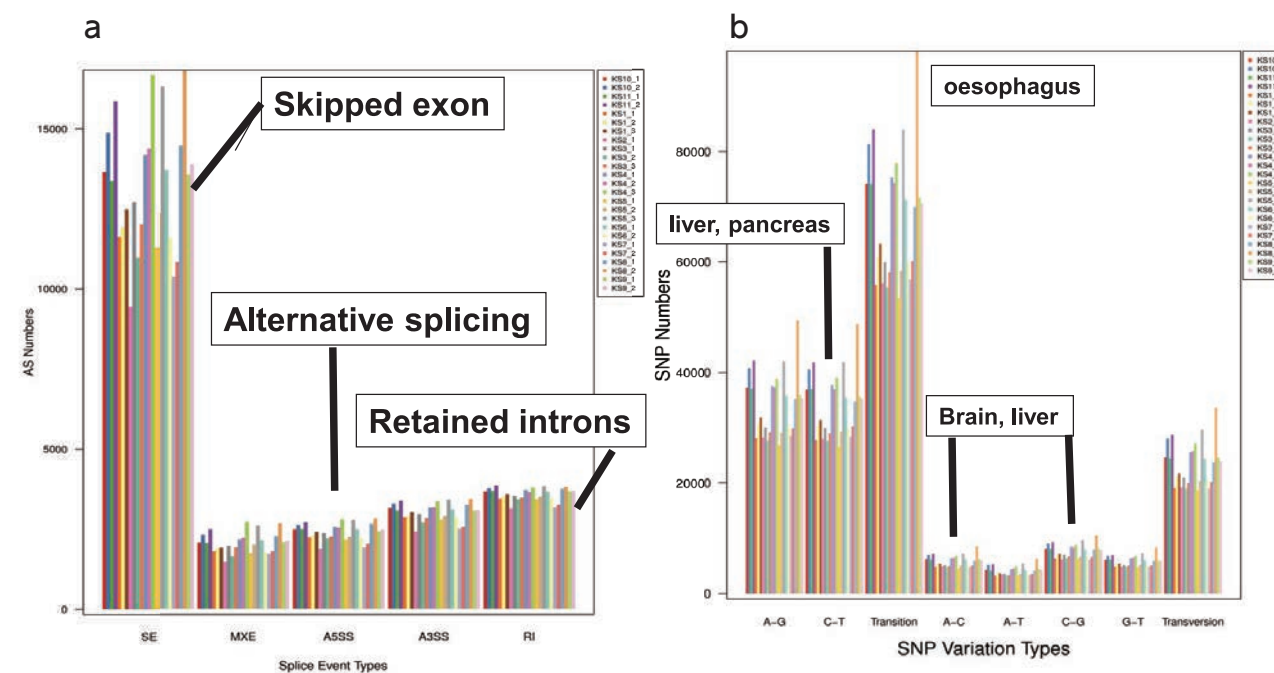


図1 Extreme SNP variance in transcribed genes

をもたらす原因とされているmiRNA等、small nuclear RNA による転写後調節の内容については、後述する。

重要なのは、同定された平均26, 711(平均)の発現遺伝子に対し、最低5タイプの変異体を検出した(図1b)。つまり、Editingの数だけ、変異体も存在することとなり、しかもそれらが発現増幅・抑制双方の変化を経時的に行い、個体の生理学的状況を激変させていく、あるいは、激変の根拠となっていくわけである。

2 10や20ではなく、2,000や5,000 / 26,711 : transcriptomes

ここから研究開始時の自分たちの貧弱な予想をはるかに凌駕した解析結果への驚愕が始まる。ヒトの構造遺伝子 expressed genes (transcriptomes) は、約26,000程度と言われる。私どもの研究でも、ほぼ同数の種類の遺伝子群を検出した。しかるに、1項で述べた変異体を含め、同一遺伝子の発現増加、あるいは発現抑制が起こり、その驚くべき変化総数を図2に示す。

ここで、ご考慮いただきたいのは、いわゆる化学療法で用いる抗癌剤、あるいは分子標的医薬により機能停止される遺伝子

は、10や20であること。もちろん、標的遺伝子、KRASやp53、p16といった標的遺伝子群が仲介する刺激伝達系に含まれる因子も数にいれば百や二百はすぐに列挙できるものの、全構造遺伝子群のうち、20%や30%に達する量変異は、同一個人と異なり、すでに同じ生物とはいえない。2,000も遺伝子数があれば違う生物が生まれることだってある(表1)。

また、驚嘆すべきは、同一個人の中で、たった4週間で、これほどの遺伝子機能増幅と同時に、遺伝子機能抑制も起こしているということ。まるで、槐耳という自然(単一種)抽出物質が、意志を持った生物のように、要不要の選別をしているかのごとくである。図に示されている様に、

- 1)この反応には、短期間で大きな発現数の変化をもたらす患者(high responder)と、全く変化がない患者(low responder)が存在する。
- 2)この反応の量的な差は、癌種に依存せず、進行度に依存するステージIV、余命あと1週間から1ヶ月と告知された例にて研究期間90日は良い状態を保って自宅療養できるようになったが、平均140日程度の延命であった。そのような例になべてlow responderであった。
- 3)反応は、1,000~5,000を超える遺伝子の飛躍的発現増加から開始される(図2赤いバー)。それが90日を経ると、一転、的な発現抑制に変化し(図2青いバー)、それが沈静化して

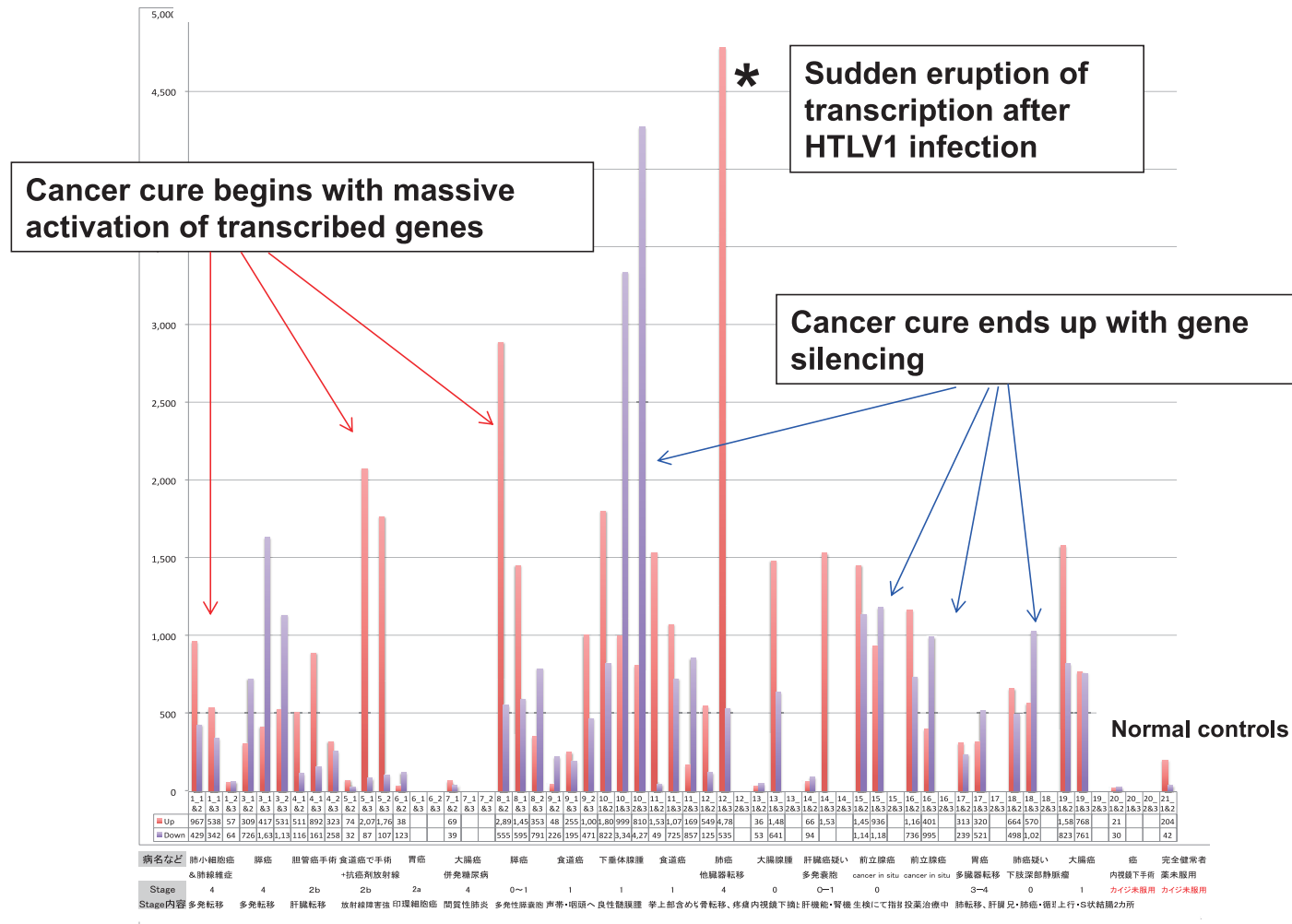


図2 Numbers of Differently Expressed genes

治療に必要な一定周期を完遂したかのように示される。つまり、このサイクルを完遂した例は、順調に回復、転移も消え、あるいは、その後一切転移も再発も起こっていない。進行癌におけるステージ~IIIまででよく観察された。転移の有無は影響しない。

3 癌細胞排除と、代謝促進(改善)、そして全身機能復調へ

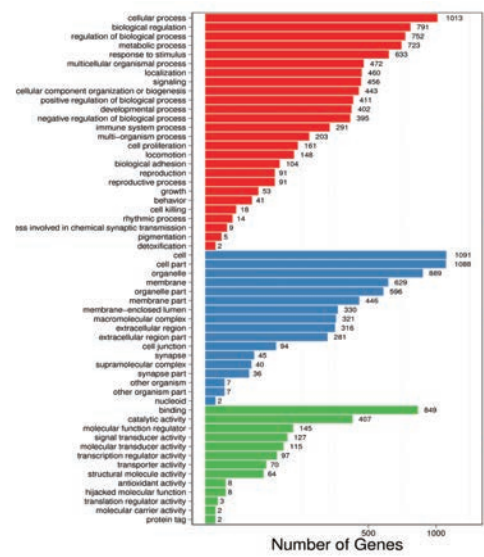
図3a, 3bに、典型的な上記活性化・増幅遺伝子群の機能別分類を示す。また、その遺伝子群の相関イメージを図3cに示す。量的変化を追うだけで息切れがしそうであるが、4週間とい、これほどの変異を全身のシステムに及ぼすことが

疾病からの回復に必要なのだ、という現実である。変異対象は、細胞増殖や免疫系のみならず、一見関係の薄そうな全身システムに及ぶ(図3a)。癌種、これまでの治療経過により多少の差はあるものの、要は、性差・年齢に関わらず、これほどのゲノム柔軟性を維持できるのが人体であり、そのために必要な、エネルギー供給、不要物処理(解毒・排泄機構)を維持しつつ、日常のQOLを格段に向上させていくことが出来るのである。

癌という事態に、細胞増殖系、オートファジーによる癌細胞破壊、免疫賦活化、のみならず、代謝経路の修正と促進、ありとあらゆる全身機能への修正・改善、活性化と同時に場合によっては同時並行で機能抑制まで必要とされている(図3b)。代謝能力、という点は、2014年の会議で紹介された通りで、本研究はその直裁的証明でもある。

さらに、図3cに、理解しやすい遺伝子リンクを併記した展開

Classification by: genetic functions



signaling pathways

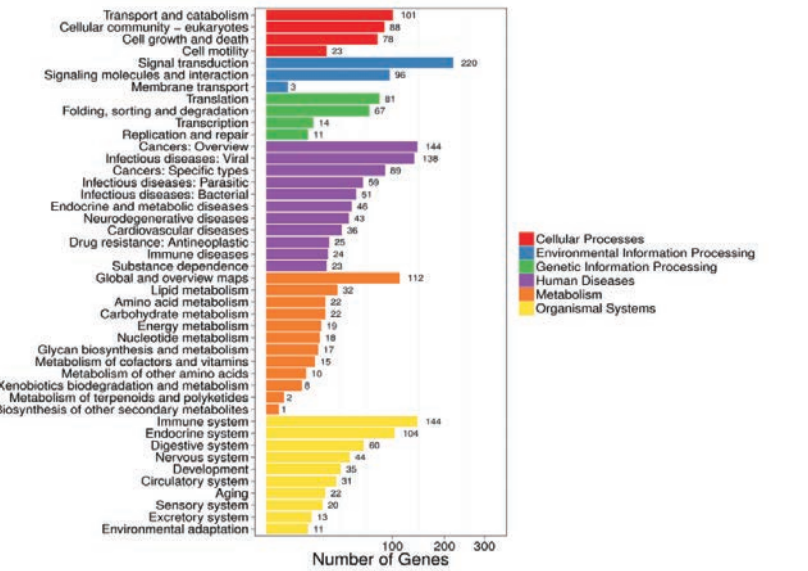


図3a Genome-wide gene alterations induced by Huaier

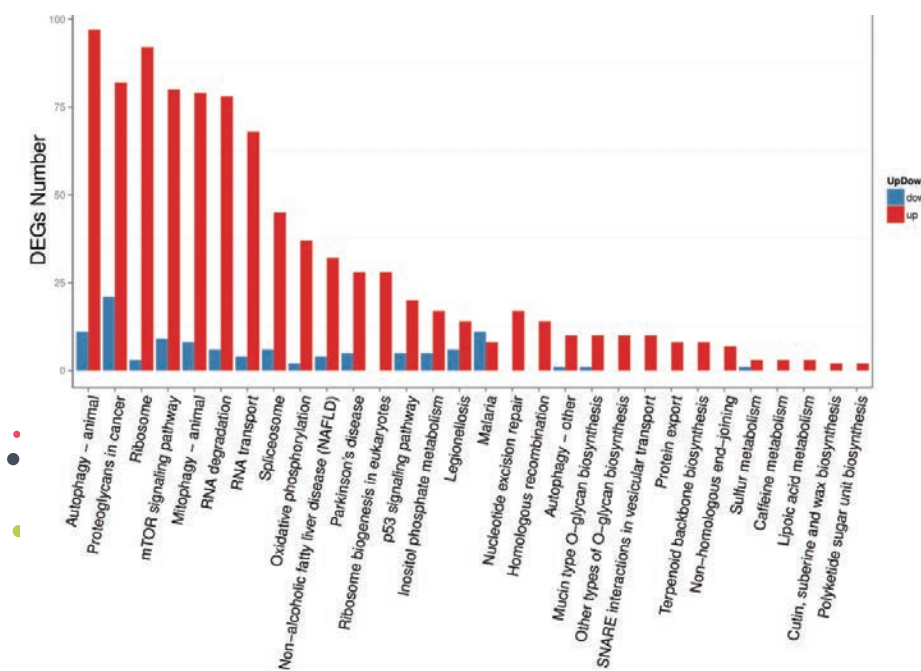


図3b Genome-wide gene alterations by the enriched pathway

図を示す。癌という状態、特に化学療法後沈静化していた遺伝子機能が、槐耳投与により爆発的機能増幅、機能修正を行い、最後にまた沈静化していくことがよくわかる。核となる暗い色調の球は、transcriptional factorであり、転写調節機構そのものが核となって、必要な遺伝子転写作業を指揮しているのがわかる。転写調節因子自体の変異は、後述する。

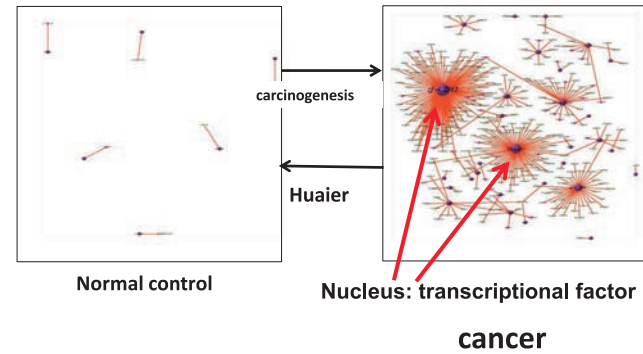


図3c Rapid upregulation and construction of genetic links After Huaier treatment

4 どのシステムが変わったか

増幅された遺伝子群が司る修復機能の詳細を表1に記す。もちろん、槐耳効能の分子基盤がHippo Signaling Pathwayであることが各種指摘伝達経路における各遺伝子変異図に示されているが、そのみならず、多くの波及伝達系・連携遺伝子群変異の影響が証明された。その他、癌遺伝子系列、癌抑制遺伝子群の変異については、表中に明記してある。これらの図は、スーパーコンピューターがまとめて描出し、バンク登録遺伝子と文献検索に立脚し、我々の為せる業ではないことを明記する。また、日和見感染についても、感染ウイルスの特定とvirionを数値として検出でき(RNAウイルスの場合)、現状のRNA シークエンス技術の進展に驚かされる。

表1 代表的変異遺伝子群(刺激伝達系の核となるもの)

癌遺伝子群	β-Catenin, c-Met, c-Myc, CDK4, CTNNB1, EGFR, HER2/neu, K-Ras, MDM2, NRF2, PDGF, PDGFR, PIK3CA, TERT
癌抑制遺伝子群	RB, PTEN, p53, AXIN, KEAP1, ARID1A, ARID2, RARb, FHIT, P16, Smad4, BRCA2, INK4a/ARF

*肺癌(小細胞癌)、肝細胞癌、膵臓癌、髄膜腫、内分泌腫瘍

最初に検出できる機能修復は、特に肝臓におけるストレス除去システムの増強、ミトコンドリアの電子伝達系制御機能の回復である。抗癌剤ターゲットの、KRAS, p53, p16、抑制系ではp53, PTENといった主要な遺伝子群への影響が顕著であり、それも、修復機能の増大のために、転写調節の増減を広範囲に行っていることに意義がある。それぞれの遺伝子は膨大な範囲のゲノムにコードされており、変異箇所も多数であるが、同様

に修復箇所、機能のバイパス回復をもたらす選択肢も膨大であることが推測される。

機能促進は、免疫賦活(T cell signaling pathway)、電子伝達系、エネルギー代謝経路などでも顕著であり、癌治療に必要とされる項目を概ね網羅している。癌種による差は検出されなかった。それ以上に、全く関連性のない分化を遂げた臓器における癌でも、治癒過程におけるゲノム変異に差が無いことに驚く。進行度ステージと槐耳服用以前の治療の影響があるばかりである。もちろん、外科手術の適応があったかどうかも大きなファクターとなる。体外摘出に成功した例では、患者体調の回復が顕著であり、術後3ヶ月にて体重増加が10キロに及ぶ例もあった。同様の症例でも、抗癌剤投与のみの例(大腸癌ステージIII)では、それが予後不良に反映している。

それにしても、このような変化を短時日でもたらすことができる物質を私は他に知らない。特に毒性が100%無視しうる、という点で希有である。

5 毒性のない転写調節因子制御

このような発現遺伝子群の変化をもたらす源基は、転写調節機能の劇的改善にある。図4abに、transcriptional factor群の変異を描出する。先の図3bにある、これらが核となって引き起こす爆発的遺伝子リンクと併せてご覧いただきたい。

培養細胞実験では、たった一つのDNA結合型転写調節因子の機能阻害、あるいは機能増幅いずれも多くは致死的结果となって終わる。かつて、リボザイムを用いた実験で転写調節機能制御実験が多く行われたが、臨床実地における実用性はその毒性から現実化していない。また、細胞実験自体も、65%どころか、ほとんど再現性がないため、方法論としては問題が多いとされている。つまりは、実験系が成り立たないのである。

それが、人体において、これほどの数の因子を変異させ、かつ、増加と同時に減少することを検出できることなど、あり得ないことである。

癌になるために、ここに列挙されている因子がどう関わるかを詳説している報告は多い。しかし、疾病から回復するためにどう制御できるか、についての報告は少ない。本稿ではただ情報の提示に終始するのみである。

6 そして最初の環に戻る: Post-transcriptional control for RNA editing

図5に転写調節機構を抑制的に誘導するsmall RNA群、miRNA (gene silencing)・piRNA・siRNAの変動を示す。これらの18-30ヌクレオチドに過ぎない遺伝子配列群は、最初に記したRNA editingの導入役とされており、miRNAは転写沈静化の役割を論じられて久しい。しかるに、今回検出したのは、未だ報告のない配列群がほとんどであり、参考にできる文献がほとんどない。ここでは、いかに暴走した転写機能の制御回復因子としての実像を紹介する(図3c参照)。

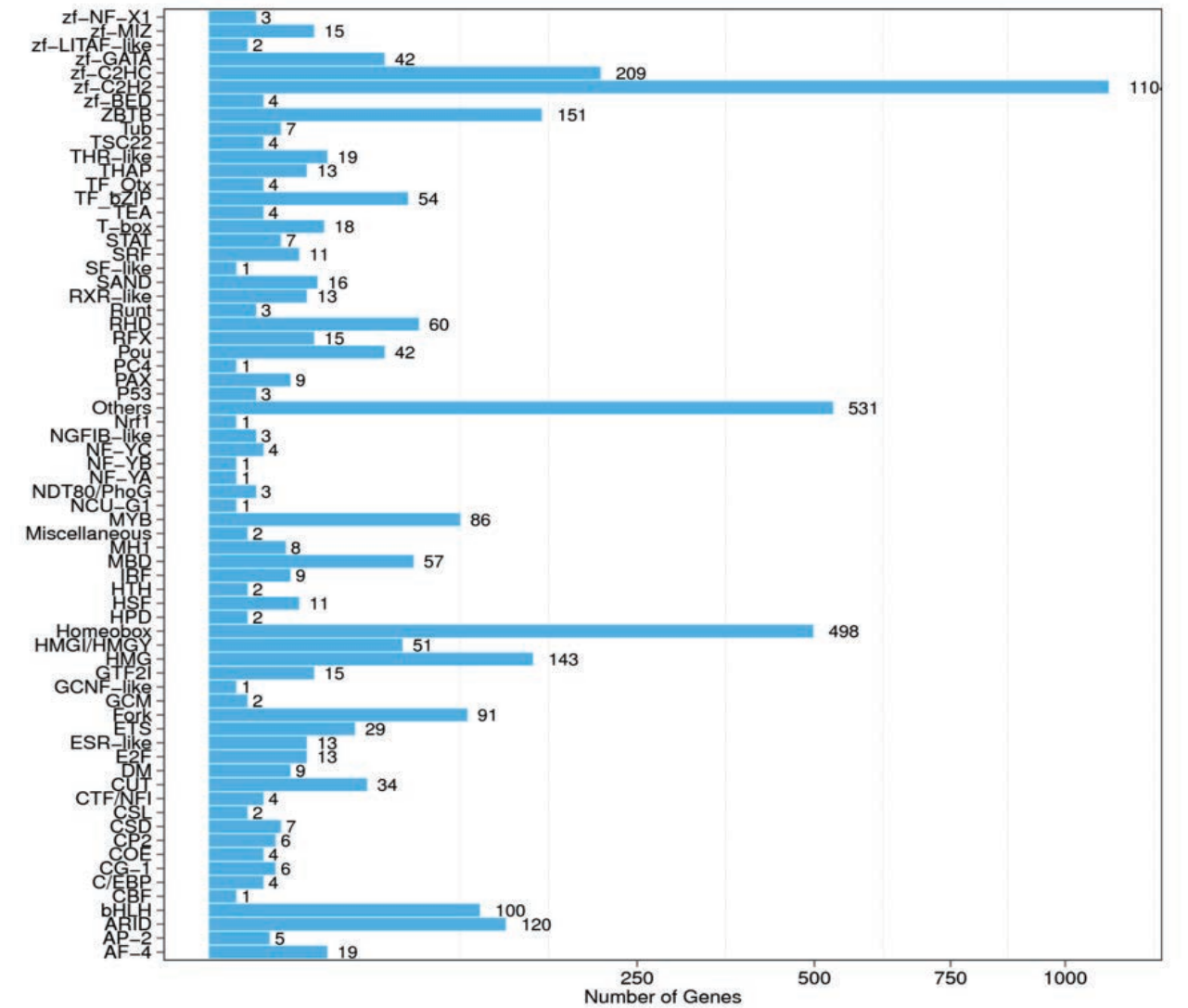


図4a Transcription Factor Family Classification(All-DEG)

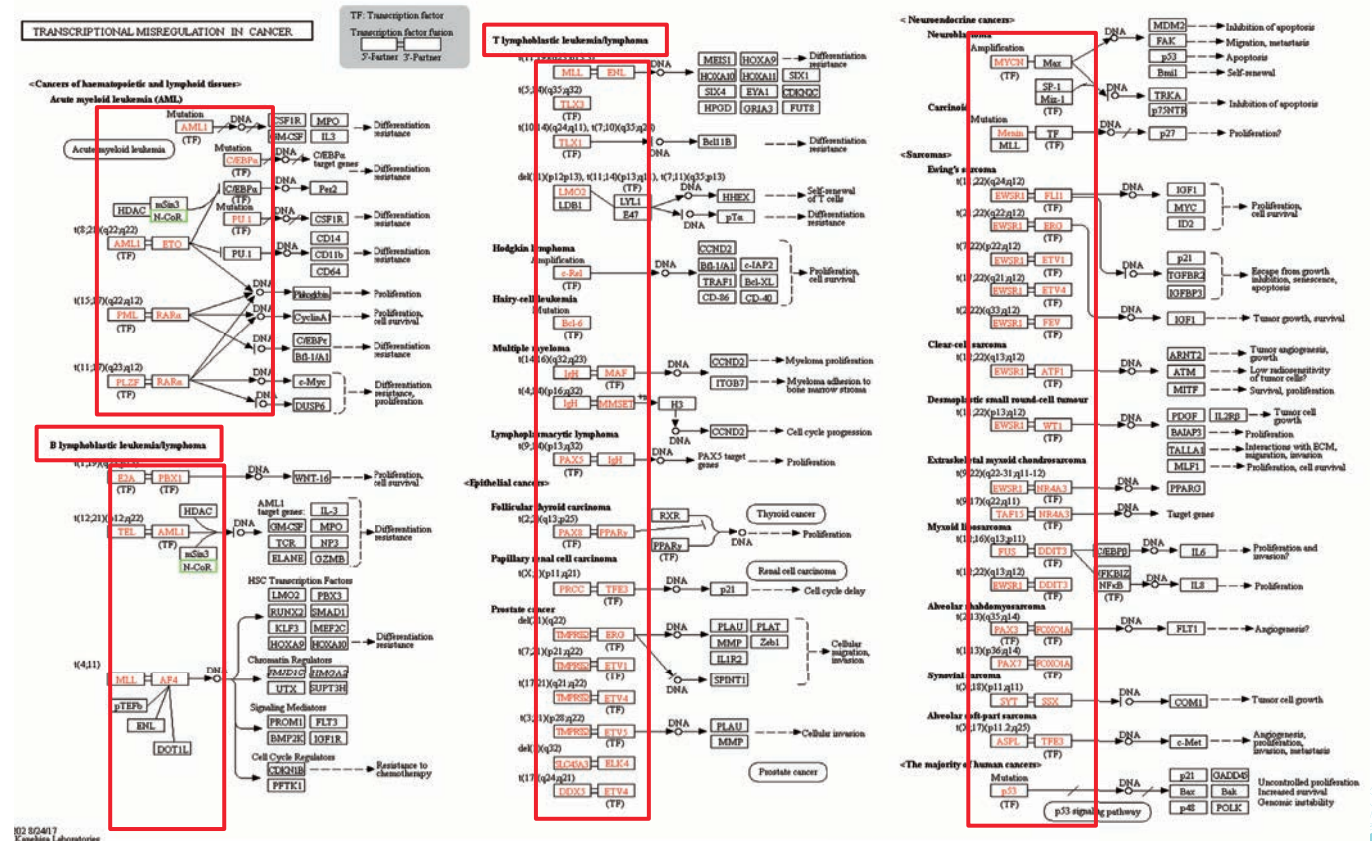


図4b with the upregulation of gene function of p53, p16, Rb, PTEN, K-Ras, and C-myc

1例のみ(食道癌)、19(最終的には20)のmiRNA配列の顕著な上昇が認められるが、この症例は、研究期間と設定した3ヶ月では発現遺伝子活性化の抑制サイクルへの移行が認められず、半年後にやっと減少傾向を認め、1年後に正常化を見た。1年後の全身状況の改善が顕著となり、槐耳効能の典型例として周囲にも、癌を恐るるに足らず、という大なる勇気を与えている。著しい量の放射線療法施行後の患者であり、放射線療法の遺伝子発現制御に与える効果の一例でもある。当然、懸念された転移・再燃は一切認められていない。

これらの結果は、槐耳効能の遺伝子発現制御の端緒を象徴するものと私は考える。

今後の課題

本稿では、槐耳効果の根源が、生理的条件下でのヒト転写調節システム回復にある、という情報解析結果を提示した。Hippo Signaling Pathwayの機能修復に関わる検証実験から始まった槐耳効能発現の分子基盤検討は、派生して影響する体内分子連携システムを通じて、免疫系の異常緩和(膠原病)、中枢神経系退行疾患の症状緩和(パーキンソン病の症状完全消失等)程度の推測しかしていなかった。しかるに、浅薄な仮説をはるかに通り越し、病から治るということを遺伝用語で解説することになったのである。

また、2012年頃から、乳癌・肺癌細胞におけるHippo pathway経由での癌抑制効果論文の発表が相次いでいる^{8,9)}。この培養細胞実験には、市販の槐耳顆粒ではなく、槐耳抽出

ペースト(水溶性)を用い、2017年秋号にて共同研究募集の広告も行った。幸い、中国・北京の遺伝学研究所のグループが、特にiPS細胞の安定した神経系分化能実験を開始する仕儀となり、培養細胞からマウス、最終的にはサルを用いた実験系に発展させる予定である。彼らも、実験の欠点は、実際の臨床服用量に換算しがたいものがあり、ヒト、特に患者での効果に結実させていくことに困難があると述べている。本臨床研究は、まず、疾病という状態に立脚して、本来の目的である快癒に向けての必要条件を網羅することを目標とし、実験系での困難を同時進行で克服できると考える。

本報告が明示するものは、癌のみならず、内因性疾患においては、単一ターゲットを破壊するという方法論に基づく治療には必ずから限界があるということ¹⁰⁾、癌の治癒過程は、短期間に驚くべきゲノムの量的変化を起こす個体の柔軟性と必要なエネルギー供給(代謝促進)が必要であるという現実論である。

まとめ

本研究のもたらした成果は、末期に脅えずに進行癌を治療できるという人類の未来である。既に、胃癌・大腸癌を筆頭に多くの癌が予防可能となっているが¹¹⁾、それでも難治性と言われる肺癌・乳癌・膵臓癌等に対し、薬剤の毒性と副作用と戦わなければならない過酷な日々を患者に強いてきた。本成果は、そのような懸念を払拭し、治療の過酷さから脱却し、たとえ進行したステージにおいてもQOLを向上させた延命と治癒に向けての努力を反映できることを示す。多くの患者が併用する補助療法

であるが、そのタイミングと内容の選択が可能ならば、予後の飛躍的改善につながる。

謝辞

当社は、中国・槐耳顆粒本社のご厚情により、今後も大規模な槐耳を用いた癌治療効果、癌のみならず槐耳有効疾患の治療・基礎解析、癌予防能検証を推進いたします。研究に参加して下さった患者ボランティアの皆様、また、治療に関わった主治医や医療機関、様々な助力をいただいた東京医科歯科大学・医科同窓会(理事長および同窓生の諸先生)、槐耳の供給にご尽力いただいた日本漢方新薬の丁 偉 様、最後になりましたが、膨大な遺伝子情報の解析と、その解釈に多大なご尽力をいただいたBGI深圳のエンジニア諸氏に心からの感謝の意を表します。

なお、本文で使用しました図は、すべてBGI深圳のスーパーコンピューターが描出したものであり、どの点、どの線一つも人間の手によるものではないことを強調させていただきます。解釈の挿入部のみ、著者の理解補助のために追加したものです。

また、シオウジョウバエ実験以来、ご教授ご指導いただいた、中国国内に広汎に展開する癌研究班の諸先生にも、今後の成功を期して心より感謝する次第です。

参考文献

- 1) 田中真奈実 癌治療近未来。創業のひろば Vol.7, 41-43, 2017.
- 2) Guo, Y., Cheng, P., & Chen, Y. Studies on the Constituents of Polysaccharide from the Hyphae of *Trametes Robiniophila*(II) – Identification of Polysaccharide from the Hyphae of *Trametes Robiniophila* and Determination of Its Molar Ratio. *J Chin Pharm U* 23, 155-157 (1992).
- 3) Tanaka, T., *et al.* Huaier Regulates Cell Fate by the Rescue of Disrupted Transcription Control in the Hippo Signaling Pathway. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 1 (4), 179-199 (2017).
- 4) Tanaka, M., Tanaka, T., Teng, F., Lin, J., Xu., Wei, D & Lu, Z. Drastic genomic alterations in a human transcriptome and transcription factor control identified in the course of cancer recovery by Huaier administration. In preparation, 2019.
- 5) Peng Z., *et al.* Comprehensive analysis of RNA-seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nature Biotechnology* 30 (3) 253-260, 2012.
- 6) Song, Y. *et al.* Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature* 91, Vol 509, 91-95, 2014.
- 7) Jiang, Y., *et al.* Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature* /10.1038/s41586-019-0987-8.
- 8) Song *et al.*, The anticancer effect of Huaier (Review). *Oncology Reports* 34, 12-21 (2015).
- 9) Mo, J.-S., Park J.W., & Guan, K.-L. Review: The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Reports*, 25 (8), 642-656, (2014).
- 10) Chongtham, A. & Agrawal, N. Crucumin modulates cell death and it protective in Huntington's disease model. *Scientific Reports*, 6:18736, DOI 10.1038/step18736 (2016).
- 11) Tanaka, T., *et al.* *Bradeion* Project: Monitoring and Targeting of Cancer: Molecular Marker Diagnosis of Cancer by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). *The Open Conference Proceedings Journal*, 1, 129-137 (2010).

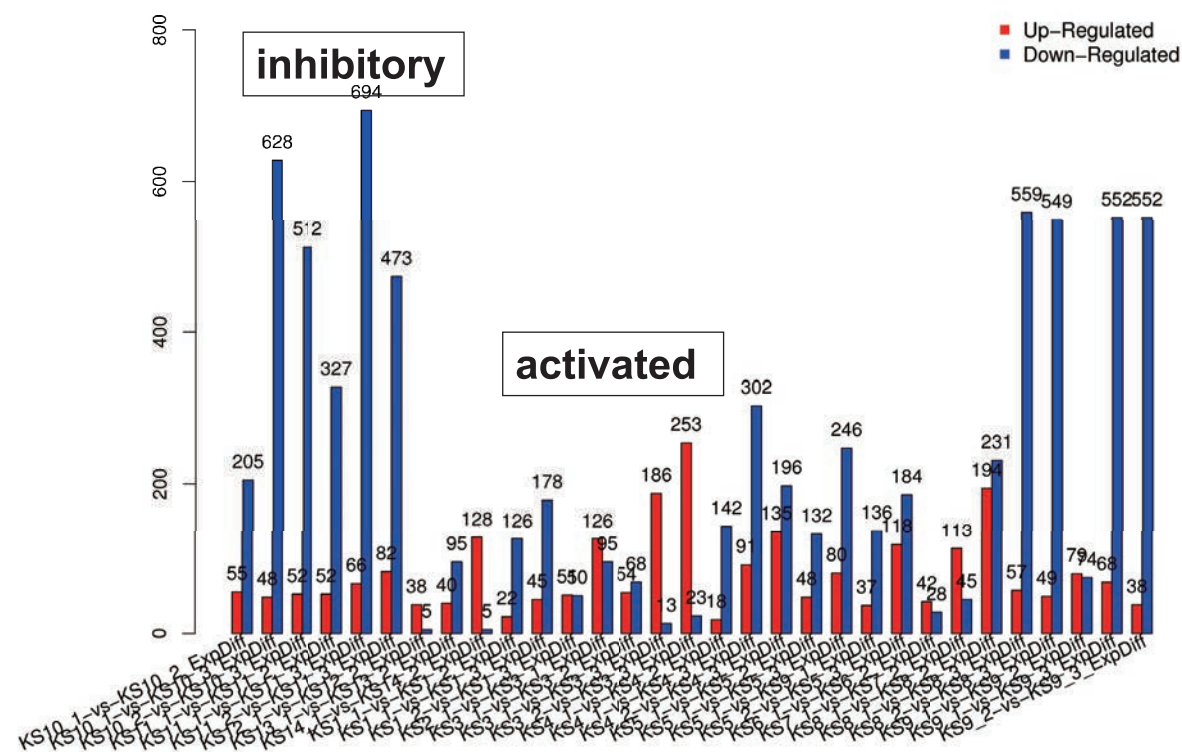


図5a Numbers of Differently Expressed miRNA

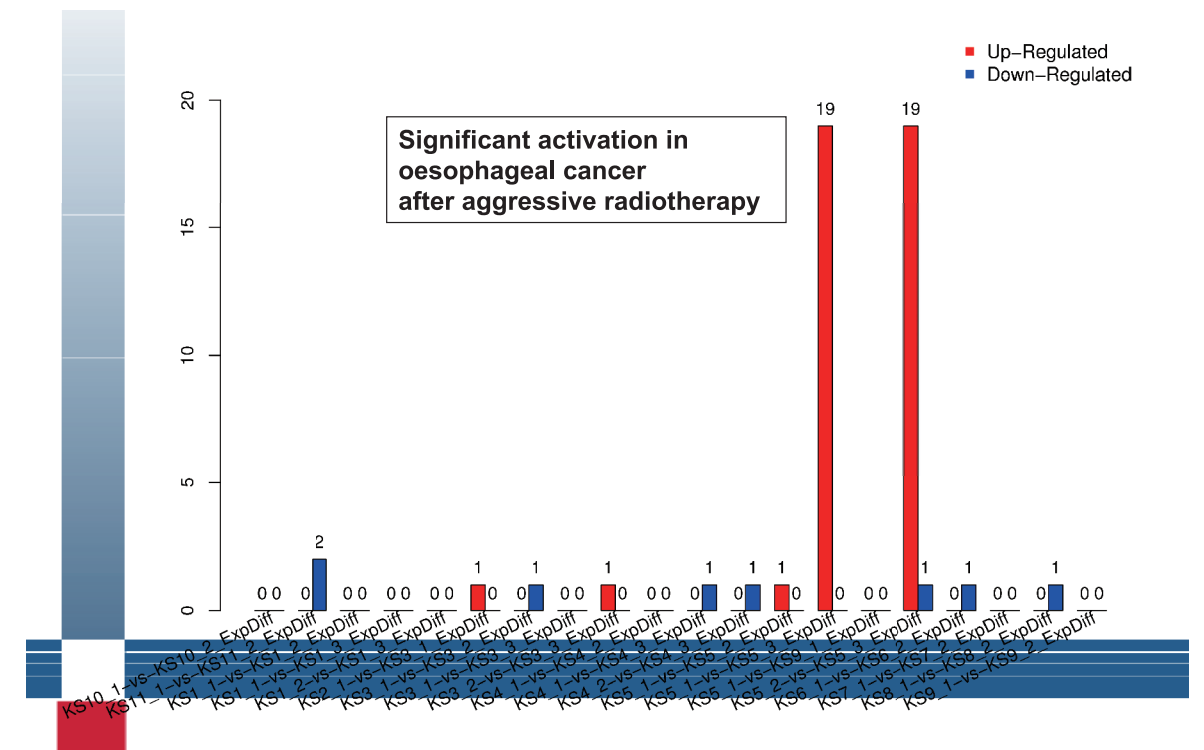


図5b Numbers of Differently Expressed siRNA