

非小細胞肺がんのエピジェネティック療法標的遺伝子の推定

田口 善弘^{1,a)} 岩館 満雄^{2,b)} 梅山 秀明^{2,c)}

概要: エピジェネティック療法はガンの有力な治療法として注目され *in vivo* での研究は多くされているが、培養細胞での実験がうまく行かないため、標的遺伝子の推定は進んでいない。本研究ではエピジェネティック療法の1つであるヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDACi) の非小細胞肺がんにおける標的遺伝子を探すために非小細胞肺がん培養細胞のリプログラミング実験における遺伝子発現プロファイルとプロモーターメチル化のデータを解析し SFRP1 を有力な候補として同定した。SFRP1 は HDACi 投与前後でヒストン修飾が有意に変化している、HDACi 抵抗性培養細胞と、非抵抗性培養細胞で遺伝子発現量が変化しているなど、有望な性質を有していることがわかった。また、SFRP1 の WNT1 への結合可能性をドッキングシミュレーションなどで評価し、SFRP1 が WNT1 への結合を通じて Wnt 信号伝達系を阻害することで発がんを誘起しているのではないかと仮説を提案した。

TAGUCHI Y-H.^{1,a)} IWADATE MITSUO^{2,b)} UMEYAMA HIDEAKI^{2,c)}

1. はじめに

がんの療法ではエピジェネティック療法が注目されている [1]。遺伝子を直接の標的とするために薬剤を開発するのではなく、エピジェネティックな効果を制御することでがんの治療を目指す。ここでエピジェネティックな効果は多岐にわたり、プロモーターメチル化 [2] やヒストン修飾、あるいは、非コード RNA を標的とすることで間接的にがん関連遺伝子の発現を制御する場合もある。本研究ではエピジェネティック療法の1つであるヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDACi) [3] を例に取り、非小細胞肺がんにおける HDACi を用いたエピジェネティック療法の標的遺伝子の推定を目指す。HDACi を用いた非小細胞肺がんのエピジェネティック療法は *in vivo* では多くの研究がされ、がんの抑制に効果があることが報告されているが標的遺伝子の特定は進んでいない [4]。これは、*in vitro* の実験である培養細胞に HDACi を投与しても期待した効果が得られず、標的遺伝子の特定が難しいためである [5]。

そこで、本研究では HDACi の培養細胞への影響を直接追求する代わりに、培養細胞のリプログラミング実験を考察す

ることにした。エピジェネティックな療法が標的とするのはエピジェネティックな効果であるが、リプログラミングで変化しているのはエピジェネティックな効果だと目されるからである。我々は非小細胞肺がんの培養細胞にリプログラミングを施した実験に注目し、リプログラミングで肺がんの遺伝子発現やプロモーターメチル化が万能細胞に近くなっている遺伝子を特定した。特に、その療法が同時に変化している遺伝子を絞り込むことで、遺伝子を特定することに成功した。これらの遺伝子の中から、特に SFRP1 に注目した。

SFRP1 について培養細胞の HDACi 投与実験と比較したところ、

- HDACi 耐性のあるなしで SFRP1 の発現量が異なっている
 - HDACi 投与前後で SFRP1 の発現量が異なっている
- ということがわかった。これらのことから SFRP1 は有望な HDACi の標的遺伝子であると思われる。

また、SFRP1 の発がんへの影響を解明するために WNT1 と SFRP1 の結合可能性を2種のドッキング数値実験で確認した。この結果、SFRP1 は WNT1 に結合するという形で Wnt 信号伝達系を阻害することを通じて発がんに寄与していることが示唆された。

¹ 中央大学理工学部物理学科
東京都文京区春日1-13-27

² 中央大学理工学部生命科学科
東京都文京区春日1-13-27

^{a)} tag@granular.com

^{b)} iwadate@bio.chuo-u.ac.jp

^{c)} umeyama@bio.chuo-u.ac.jp

本稿は TBC2015 での発表内容であり、BMC Med Genomics Suppl に原著論文として掲載予定。

2. 方法

2.1 遺伝子発現プロファイルとプロモーターメチル化プロファイル

遺伝子発現プロファイル、プロモーターメチル化プロファイルは GEO ID GSE35913 からダウンロードした。それぞれのプロファイルはサンプルごとに平均0、分散1に規格化されている。サンプル数は8種類の培養細胞 (H1:ES細胞、H358とH460: 非小細胞肺癌、IMR90: 胎児肺、iPCH358, iPCH460, iPSIMR90: 上記細胞から作られたiPS細胞、piPCH358: 再分化したiPSH358) を3回ずつ計測した、8カテゴリ×3繰り返し=24サンプルである。

2.2 カテゴリ回帰分析を用いた変数選択 カテゴリ回帰分析

$$x_{ij} = C_{0i} + \sum_{\ell} C_{i\ell} \delta_{\ell j}$$

(但し、 $\delta_{\ell j}$ は j 番目のサンプルが、上記8カテゴリのうちの ℓ 番目のカテゴリに属している時に1 それ以外はゼロとなる変数) を実行することで、カテゴリと整合的な量を持つ i 番目の変数を選択する。回帰分析がよく当てはまる順(通常はF検定を用いて計算したP値が小さい順)に変数選択を行う。

2.3 主成分分析 (PCA) を用いた教師なし学習による変数選択 [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15], [16]

x_{ij} を i 番目の遺伝子の j 番目のサンプルの遺伝子発現量/プロモーターメチル化であるとする。行列 X は x_{ij} を成分とする行列であるとする。ここで上記の様に $\sum_i x_{ij} = 0, \sum_i x_{ij}^2 = 1$ である。通常のPCAと異なり主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択ではなく遺伝子を埋め込む。 i 番目の遺伝子の第 k 主成分得点 u_{ki} はグラム行列 XX^T の第 k 固有ベクトルの第 i 成分で与えられ、 j 番目のサンプルの第 k 主成分負荷量 v_{kj} は $v_{kj} = \sum_i u_{ki} x_{ij}$ で計算できる。

主成分分析を用いた教師なし学習による変数選択では次に、変数選択に用いる主成分の集合 $\Omega_k = \{k_1, k_2, \dots, k_K\}$ を何らかの方法で選択する。次にこれらの主成分について外れ値を大きい順に一定数を選んで変数選択とする。

3. 結果

3.1 カテゴリ回帰分析を用いた変数選択

遺伝子発現プロファイル、プロモーターメチル化それぞれについてカテゴリ回帰分析を行い、上位300プローブをそれぞれ選択した。両方に共通に選ばれている遺伝子を

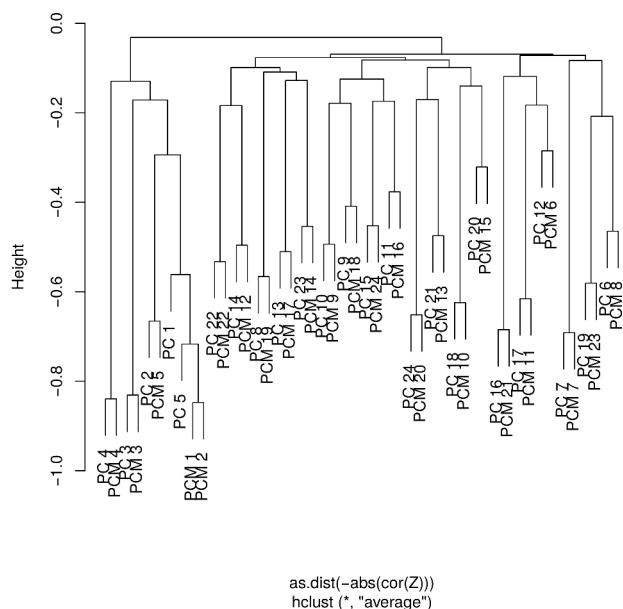


図1 遺伝子発現量、プロモーターメチル化の主成分負荷量 v_{kj} の階層的クラスタリング。PC k は遺伝子発現量から得られた第 k 主成分負荷量、PCM k はプロモーターメチル化から得られた第 k 主成分負荷量を表す。距離は相関係数の絶対値に負符号をつけたものを用い、アルゴリズムは平均距離法を用いている。この結果から遺伝子発現量のとプロモーターメチル化の第3、4主成分が負荷量がそれぞれ強く相関していることがわかる

リストアップした。

3.2 主成分分析 (PCA) を用いた教師なし学習による変数選択

このデータは遺伝子発現とプロモーターメチル化を同一サンプルで計測した対応サンプルのデータなので、プロモーターメチル化と遺伝子の間に相関関係がある遺伝子を選択することでプログラミングで遺伝子発現が変動している遺伝子を特定する。これを行うためにまず主成分負荷量ベクトル $v_k = (v_{k1}, v_{k2}, \dots, v_{kM})$ を遺伝子発現量とプロモーターメチル化で計算し、-(相関係数の絶対値)を距離として平均距離法でクラスタリングを行った(図1)。この結果、第3、4主成分負荷量が強い相関を持っていることがわかったので、第3、4主成分得点の絶対値が大きいプローブを300個ずつ選び、両方に共通に選ばれている遺伝子をリストアップした。

3.3 選択された遺伝子の検討

表1に2つの手法で選ばれた遺伝子の一覧と、その生物学的な評価をまとめる。まずわかることは、遺伝子発現プロファイルとプロモーターメチル化は別々の計測であり、生物学的な背景がなければ両者を用いた変数選択を行っても遺伝子は一致しない。今回300個程度しか選択しておらず、全遺伝子は数万個あることを考えると、遺伝子の選択率は1%程度にすぎず、これだけの数のオーバーラップ

は偶然では得られない。このことから変数選択そのものがうまく行っていることはわかる。また、教師あり学習（カテゴリ回帰）に比べて（PCAを用いた）教師なし学習による遺伝子の選択数が決して劣るものではないこと、むしろ、数が多いであることがわかる。教師なし学習はカテゴリ情報を全く使っていないことを考えると、これは驚くべきことであると言える。更に、○の数（生物学的な評価）も同等以上であり、教師なし学習による変数選択は有効に機能していることがわかる。同時に、教師あり学習と教師なし学習により選ばれた遺伝子には重なりが少なく、独立に実行する価値も大きいことが見て取れる。

以下、細かく見ていこう。まず（A）はgendooサーバ[17]による評価である。同サーバは文献から疾患と遺伝子の同時出現確率を計算して、遺伝子と疾患の関係をP値で表現するサーバであり、いわば、機械学習を用いた先行文献検索となっている。（A）ではP値が0.05以下のものの中になんらかのがんと相関が報告されているかどうかをリストした（詳細は刊行予定の原著論文参照）。大部分の遺伝子がなんらかのがんと関係していると報告されているとわかる。がん遺伝子は一般に複数のがんに関係することが多く、この結果はこれらの遺伝子が潜在的に非小細胞肺癌にも関係しているという可能性を強く示唆する。（B）は個々のプロブレベルで見た場合に有意の負の相関が観測できるかをリストしている。PCAを用いた教師なし学習はもとより、カテゴリ回帰分析を用いた変数選択でも、遺伝子発現プロファイルとプロモーターメチル化が負の相関を持つという基準は遺伝子選択に際しては全く入っていないにも関わらず、大部分が負の相関をもっている。このことから、遺伝子発現とプロモーターメチル化のいわゆる統合解析がうまくいっており、その面からもまた教師なし学習が教師あり学習と同等程度の成果を上げていることがわかる（相関係数の値、P値、発現量／プロモーターメチル化のグラフは刊行予定の原著論文参照）。（C）gendooサーバによる結果はあくまで確率ベースなので多数の報告がなければヒットしない。たった一報の確実な実験では漏れてしまう。この部分を補うために、我々は非小細胞肺癌との関連を報告した先行研究があるかどうかを文献検索で調べた。その結果、大部分の遺伝子が一報以上の既報を伴っているのみならず、教師なし学習が教師あり学習と同等程度の成果を上げていることもわかった（具体的な先行研究のリストについては刊行予定の原著論文参照）。これらのことから、教師あり学習、教師なし学習とも生物学的に考えて妥当な遺伝子の選択に成功しており、また、両者のパフォーマンスは控えめに見ても同等で、かつ、独立であることが示唆された。

個々の遺伝子をみたのではこれらの遺伝子がどのような意味でがん化に関係しているのかは見えにくい。そこで表1に含まれている全遺伝子を2つのアノテーションサー

表1 選択された遺伝子の一覧。*がついているものは複数回選択されているもの。（A）Gendooサーバによりなんらかのガンとの関係が報告されているもの（B）個々のプロブレベースで有意な負の相関がみられるもの（C）文献検索により非小細胞肺癌との関係を示唆する先行研究が一報以上みつかるもの（D）文献検索によりWnt/ β -カテニン信号伝達経路との関連を示唆する先行研究が一報以上みつかるもの

RefSeq mRNA	遺伝子名				
	カテゴリ回帰	(A)	(B)	(C)	(D)
NM_020436.2	<i>SALL4</i>	○	○	○	○
NM_002354.1	<i>TACSTD1 (EPCAM) (*)</i>	○	○	○	○
NM_001146.3	<i>ANGPT1</i>	○		○	○
NM_002353.1	<i>TACSTD2 (*)</i>	○	○	○	○
NM_032880.2	<i>IGSF21</i>				
NM_004429.3	<i>EFNB1</i>	○		○	○
NM_177524.1	<i>MEST</i>	○	○	○	○
NM_013243.2	<i>SCG3</i>			○	
主成分分析					
第3主成分					
NM_001992.2	<i>F2R</i>	○	○	○	○
NM_015881.5	<i>DKK3</i>	○	○	○	○
NM_003012.3	<i>SFRP1</i>	○	○	○	○
NM_213606.1	<i>SLC16A12</i>				
NM_019102.2	<i>HOXA5</i>	○	○	○	○
NM_004321.4	<i>KIF1A</i>		○	○	○
NM_004893.2	<i>H2AFY</i>	○	○	○	
NM_005176.4	<i>ATP5G2</i>				
NM_014220.2	<i>TM4SF1</i>	○	○	○	○
NM_201525.1	<i>GPR56 (*)</i>	○	○	○	○
NM_005980.2	<i>S100P</i>	○	○	○	○
第4主成分					
NM_021102.2	<i>SPINT2</i>	○	○	○	○
NM_002354.1	<i>EPCAM (*)</i>	○	○	○	○
NM_004360.2	<i>CDH1</i>	○	○	○	○
NM_002353.1	<i>TACSTD2 (*)</i>	○	○	○	○
NM_005562.1	<i>LAMC2</i>	○	○	○	○
NM_145899.1	<i>HMGA1</i>	○	○	○	○
NM_005558.3	<i>LAD1</i>		○	○	
NM_201525.1	<i>GPR56 (*)</i>	○	○	○	
NM_004566.2	<i>PFKFB3</i>	○		○	○
NM_005218.3	<i>DEFB1</i>	○		○	
NM_002727.2	<i>SRGN</i>	○	○	○	
NM_004181.3	<i>UCHL1</i>	○	○	○	○
NM_000691.3	<i>ALDH3A1</i>	○	○	○	○
NM_012307.2	<i>EPB41L3</i>	○		○	○
NM_021136.2	<i>RTN1</i>	○	○	○	
NM_005559.2	<i>LAMA1</i>	○		○	○

バ（g:Profiler [18], TargetMine [19]）にアップロードし、それらが全体としてどのような機能に関係しているのかをみることを試みた。その結果、これらの遺伝子は細胞表面のタンパクを多く含み、また、細胞間の固着性や細胞増殖に関係することが示唆された。これらはがん化や転移などにおいて重要な要素であり、機能的な面からも遺伝子の選択の妥当性が支持される結果になった。

表 2 アノテーションサーバの結果。TargetMine の場合、P 値の正規化は BH 基準をもちいている。

		P-values	Number of genes
Targetmine			
GO term	Extracellular region [GO:0005576]	2.03×10^{-3}	21
	Lateral plasma membrane [GO:0016328]	8.55×10^{-3}	3
GOSlim term	Extracellular region [GO:0005576]	6.43×10^{-5}	21
	Locomotion [GO:0040011]	1.34×10^{-2}	9
	Cell adhesion [GO:007155]	1.34×10^{-2}	7
	Cell junction organisation [GO:0034330]	1.74×10^{-2}	4
	Anatomical structure development [GO:0048856]	1.76×10^{-2}	14
g:Profiler			
GO Term	Cell proliferation [GO:0008283]	1.42×10^{-2}	12
	Regulation of cell proliferation [GO:0042127]	4.83×10^{-2}	10
	Regulation of cell adhesion [GO:0030155]	1.58×10^{-2}	6
	Cellular component movement [GO:0006928]	3.67×10^{-3}	11
	Extracellular region [GO:0005576]	3.94×10^{-4}	19
TF	PPAR, HNF-4, COUP, PAR [TF:M00762.4]	2.72×10^{-2}	18

3.4 エピジェネティック候補遺伝子の推定

今回の手法で、非小細胞肺がんのリプログラミング実験に於いて重要な遺伝子の選択に成功したことは間違いないが、本研究の目的は非小細胞肺がんのエピジェネティック療法の候補遺伝子を探すことである。この目的のためには表 1 にある遺伝子の中からエピジェネティック療法の候補遺伝子を探す必要がある。ここで我々は近年、非小細胞肺がんの関連が忠告されている Wnt/ β -カテニン信号伝達経路 [20] に注目した。調べたところ、表 1 にある遺伝子の多くが同回路に関連しているという先行研究があることがわかった(表 1D)。一方で図 1 にある遺伝子はエピジェネティック療法に関係しているという先行研究がある遺伝子を多く含むこともわかった(詳細は刊行予定の原著論文参照)。

3.5 エピジェネティック候補遺伝子:SFRP1

以上の様な考察から我々は SFRP1 を特にエピジェネティック療法の候補遺伝子として選んだ。以下にその根拠を示す。我々は HDACi に注目した。HDACi はエピジェネティックセラピーの有力な候補薬剤であり、エピジェネティック療法の対象遺伝子は HDACi の標的である可能性が高いと思ったからである。表 3 の上半分は、様々な HDACi に抵抗性がある培養細胞と無い培養細胞の間で遺伝子の発現量を比べたものである [21]。SFRP1 は非小細胞肺がんの 2 つのサブタイプに於いて、非抵抗性の培養細胞のほうが抵抗性の培養細胞より発現量が多いことがわかる。このことは、SFRP1 が HDACi の標的遺伝子であることの傍証になる。参考にために表 1 に含まれているもうひとつの重要な Wnt/ β -カテニン信号伝達経路に関連していることが知られている遺伝子である DKK 3 の結果も比較のため載せた。こちらは有意な差がなく、SFRP1 の方が HDACi

の標的遺伝子である可能性が高いことがわかる。表 3 の下半分ではより直接的に、HDACi 投与後のヒストン修飾の変化を見た [22]。SFRP1 は A549 と H1299 という 2 種類の非小細胞肺がんの培養細胞に於いて、HDACi の投与によってヒストン修飾の量が有意に増加しており、SFRP1 が HDACi の標的遺伝子であるという予想をサポートする。一方、Wnt/ β -カテニン信号伝達経路に関連していることが知られている他の 3 つの遺伝子(DKK3, TACSTD1, SALL4)にはこのような効果がみられない。また、SFRP1 においても非小細胞肺がんの培養細胞ではない CL1-1 ではこのような効果はみられていないことは興味深い。以上より、我々は SFRP1 を非小細胞肺がんのエピジェネティック療法の標的として特定した。

3.6 SFRP1 と Wnt/ β -カテニン信号伝達経路

最後に Wnt/ β -カテニン信号伝達経路における SFRP1 の機能を同定した。一般に SFRP は WNT 遺伝子と結合して、WNT 遺伝子が Wnt/ β -カテニン信号伝達経路の活性化を阻害することが知られている [23]。しかし、SFRP1 が実際に WNT 遺伝子のいずれかに結合するという報告は残念ながら存在しない。そこで我々は二種の数値計算を用いて SFRP1 の WNT 遺伝子の一種である WNT 1 への結合可能性を評価した。SFRP1 と WNT1 の結合に注目したのは、アフリカツメガエルで SFRP1 の相同タンパクである FRZB1 が WNT1 に結合することが知られているからである [24]。まず、SFRP1 と WNT1 の 3 次元構造を RaptorX [25] で推定した。次に、推定した構造をまずは ZDOCK [26] にアップロードしてベストの複合体の構造を特定した。この構造をさらに Fiberdock [27] を用いて最適化した構造が図 2(a) である。この構造は SFRP1 と CRドメインを共有する FZ8 と WNT8 の実験で得られた複合

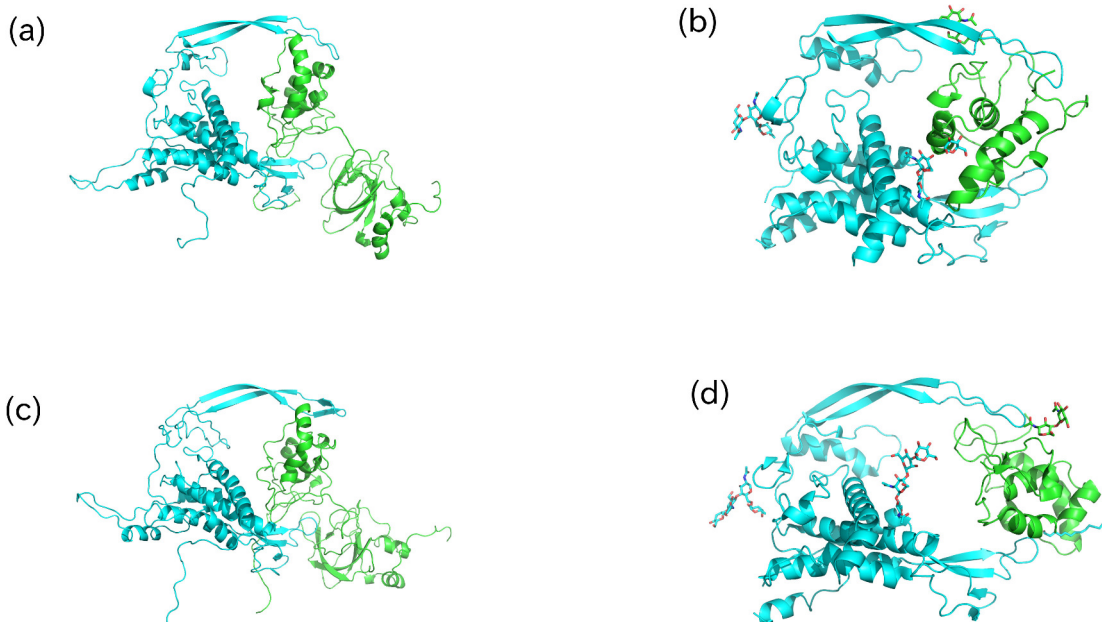


図 2 タンパク質複合体 (a) WNT1 (cyan) + SFRP1 (light green) by Fiberdock + ZDOCK, (b) WNT8 (cyan) + CRD of FZ8 (light green) by Fiberdock + ZDOCK, (c) WNT1(cyan) + SFRP1 (light green) by GROMACS (time = 2 ns), (d) WNT8 (cyan) + CRD of Fz8 (light green) in PDB (PDB ID: 4F0A)

表 3 HDACi 耐性／非耐性培養細胞間の遺伝子発現量の比較、及び、ヒストン修飾 (H3K9K14ac) の HDACi 投与による増減の比較。有意の差があるものは太字で表記

遺伝子発現量				
Adenocarcinoma				
	<i>P</i> -value	非抵抗性		抵抗性
SFRP1	4.64×10^{-4}	611.06	>	92.60
DKK3	6.73×10^{-2}	263.27	>	30.59
Squamous cell carcinoma				
SFRP1	7.42×10^{-3}	304.53	>	49.43
DKK3	4.61×10^{-1}	261.38	<	506.25
ヒストン修飾 (H3K9K14ac)				
	<i>P</i> -value	直後		2 時間後
SFRP1	(A549)	2.90×10^{-2}	-1.29	< -0.52
	(H1299)	4.06×10^{-2}	-2.51	< -1.85
	(CL1-1)	8.71×10^{-1}	-1.38	< -1.34
DKK3	(A549)	6.19×10^{-1}	-1.17	< -1.01
	(H1299)	1.98×10^{-3}	-1.70	< -0.48
	(CL1-1)	1.48×10^{-1}	-0.59	> -1.13
TACSTD1	(A549)	4.74×10^{-1}	-1.70	< -1.37
	(H1299)	1.51×10^{-1}	-2.61	< -2.20
	(CL1-1)	8.62×10^{-1}	-2.03	> -2.09
SALL4	(A549)	1.71×10^{-3}	-2.44	< -1.05
	(H1299)	5.23×10^{-1}	-2.62	> -2.86
	(CL1-1)	1.03×10^{-4}	0.97	> -0.59

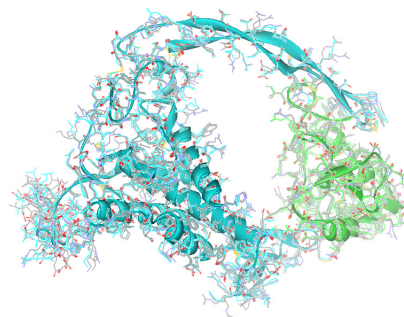


図 3 FAMS complex を用いて推定された WNT1(cyan)+SFRP1(light green) の複合体の立体構造。SFRP1 は CR ドメイン部分のみの推定。

体の構造 (図 2(d)) によく似ている。このことは SFRP1 と WNT1 の結合があり得ることを示している。さらに、この予想を裏付けるために、ZDOCK と Fiberdock を用いて、FZ8 と WNT8 の複合体を予測した (図 2(b))。この結果 WNT8 のアームの間に正しく FZ8 が結合する構造がえられることがわかった。このことも、図 2(a) にみられる SFRP1 と WNT1 の結合構造の正しさを支持する。ZDOCK と Fiberdock によって得られた結合構造は 4F0A を雛形にして実行した FAMS Complex [28] を用いても再現できることも確認した (図 3)。この様に複数の方法で同じような WNT1 と SFRP1 の結合構造が得られることは SFRP1 の WNT1 への結合の確からしさを裏付けるも

のであるとすることができる。

最後に、ZDOCK と Fiberdock を用いて得られた構造の安定性をしらべるために GROMACS [29] を用いた分子動力学シミュレーション (MD) を行った。図 2(a) で得られた構造を初期状態とし、体積と温度一定の予備実験 0.1ns と圧力温度一定の予備実験 0.1ns のあと、2 ns の安定化実験を行った。ZDOCK と Fiberdock で得られた構造自体は安定ではなく激しく揺らいだものの、WNT1 と SFRP1 の位置関係 (WNT1 のアーム内に SFRP1 が入っているという構造) 自体は、2 ns の計算の後でも安定であった (図 2(c))。このことから WNT1 と SFRP1 の複合体の構造は安定なものであると結論した。

4. 結言

本研究では非小細胞肺がんのエピジェネティック療法の標的遺伝子を探すために非小細胞肺がんの培養細胞のリプログラミング実験の遺伝子発現プロファイル/プロモーターメチル化プロファイルを、カテゴリ回帰分析と PCA を用いた、教師あり/教師なし学習による変数選択を用いて統合的に解析し、非小細胞肺がんに関係するという報告があり、かつ、遺伝子発現プロファイルとプロモーターメチル化が有意の負相関を持っている遺伝子を多数特定した。これらの遺伝子が、Wnt/ β -カテニン信号伝達経路と頻繁に関係していることから、同信号伝達回路に注目し、SFRP1 をエピジェネティック療法の標的遺伝子候補とした。実際、非小細胞肺がんの培養細胞に於いて SFRP1 は HDACi との関係で、遺伝子の発現やヒストン修飾が変化しており、エピジェネティック療法の標的となっている可能性が高いことがわかった。また、SFRP1 の Wnt/ β -カテニン信号伝達経路への影響の候補として、WNT1 への結合を仮定し、これを計算機を用いて裏付けた。今後の実験的な検証が待たれる。

謝辞 この研究は科研費 (23300357 及び 2610528) と中央大学共同研究プロジェクトにサポートされている。

参考文献

- [1] Mehta, A., Dobersch, S., Romero-Olmedo, A. J. and Barreto, G.: Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy, *Cancer Metastasis Rev.* (2015).
- [2] Momparler, R. L.: Epigenetic therapy of non-small cell lung cancer using decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine), *Front Oncol*, Vol. 3, p. 188 (2013).
- [3] Huffman, K. and Martinez, E. D.: Pre-clinical studies of epigenetic therapies targeting histone modifiers in lung cancer, *Front Oncol*, Vol. 3, p. 235 (2013).
- [4] Jakopovic, M., Thomas, A., Balasubramaniam, S., Schrupp, D., Giaccone, G. and Bates, S. E.: Targeting the epigenome in lung cancer: expanding approaches to epigenetic therapy, *Front Oncol*, Vol. 3, p. 261 (2013).
- [5] Vendetti, F. P., Topper, M., Huang, P., Dobromilskaya, I., Easwaran, H., Wrangle, J., Baylin, S. B., Poirier, J. T. and Rudin, C. M.: Evaluation of azacitidine and entino-

- stat as sensitization agents to cytotoxic chemotherapy in preclinical models of non-small cell lung cancer, *Oncotarget*, Vol. 6, No. 1, pp. 56–70 (2015).
- [6] Taguchi, Y. H., Iwadate, M. and Umeyama, H.: Principal component analysis-based unsupervised feature extraction applied to in silico drug discovery for post-traumatic stress disorder-mediated heart disease, *BMC Bioinformatics*, Vol. 16, No. 1, p. 139 (2015).
- [7] Taguchi, Y.-h., Iwadate, M., Umeyama, H., Murakami, Y. and Okamoto, A.: Heuristic principal component analysis-based unsupervised feature extraction and its application to bioinformatics, *Big Data Analytics in Bioinformatics and Healthcare* (Wang, B., Li, R. and Perrizo, W., eds.), pp. 138–162 (2015).
- [8] Taguchi, Y.-h. and Okamoto, A.: Principal Component Analysis for Bacterial Proteomic Analysis, *Pattern Recognition in Bioinformatics* (Shibuya, T., Kashima, H., Sese, J. and Ahmad, S., eds.), LNCS, Vol. 7632, Springer International Publishing, Heidelberg, pp. 141–152 (2012).
- [9] Murakami, Y., Toyoda, H., Tanahashi, T., Tanaka, J., Kumada, T., Yoshioka, Y., Kosaka, N., Ochiya, T. and Taguchi, Y. H.: Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease, *PLoS ONE*, Vol. 7, No. 10, p. e48366 (2012).
- [10] Ishida, S., Umeyama, H., Iwadate, M. and Taguchi, Y. H.: Bioinformatic Screening of Autoimmune Disease Genes and Protein Structure Prediction with FAMS for Drug Discovery, *Protein Pept. Lett.*, Vol. 21, No. 8, pp. 828–39 (2014).
- [11] Taguchi, Y. H. and Murakami, Y.: Principal component analysis based feature extraction approach to identify circulating microRNA biomarkers, *PLoS ONE*, Vol. 8, No. 6, p. e66714 (2013).
- [12] Kinoshita, R., Iwadate, M., Umeyama, H. and Taguchi, Y. H.: Genes associated with genotype-specific DNA methylation in squamous cell carcinoma as candidate drug targets, *BMC Syst Biol*, Vol. 8 Suppl 1, p. S4 (2014).
- [13] Taguchi, Y. H. and Murakami, Y.: Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases?, *BMC Res Notes*, Vol. 7, p. 581 (2014).
- [14] Murakami, Y., Tanahashi, T., Okada, R., Toyoda, H., Kumada, T., Enomoto, M., Tamori, A., Kawada, N., Taguchi, Y. H. and Azuma, T.: Comparison of Hepatocellular Carcinoma miRNA Expression Profiling as Evaluated by Next Generation Sequencing and Microarray, *PLoS ONE*, Vol. 9, No. 9, p. e106314 (2014).
- [15] Umeyama, H., Iwadate, M. and Taguchi, Y. H.: TINAGL1 and B3GALNT1 are potential therapy target genes to suppress metastasis in non-small cell lung cancer, *BMC Genomics*, Vol. 15 Suppl 9, p. S2 (2014).
- [16] Taguchi, Y.-h.: Integrative Analysis of Gene Expression and Promoter Methylation during Reprogramming of a Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line Using Principal Component Analysis-Based Unsupervised Feature Extraction, *Intelligent Computing in Bioinformatics* (Huang, D.-S., Han, K. and Gromiha, M., eds.), LNCS, Vol. 8590, Springer International Publishing, Heidelberg, pp. 445–455 (2014).
- [17] Nakazato, T., Bono, H., Matsuda, H. and Takagi, T.: Gendoo: functional profiling of gene and disease features using MeSH vocabulary, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 37, No. Web Server issue, pp. W166–169 (2009).

- [18] Chen, Y. A., Tripathi, L. P. and Mizuguchi, K.: Target-Mine, an integrated data warehouse for candidate gene prioritisation and target discovery, *PLoS ONE*, Vol. 6, No. 3, p. e17844 (2011).
- [19] Reimand, J., Arak, T. and Vilo, J.: g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update), *Nucleic Acids Res.*, Vol. 39, No. Web Server issue, pp. W307–315 (2011).
- [20] Stewart, D. J.: Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 106, No. 1, p. djt356 (2014).
- [21] Miyanaga, A., Gemma, A., Noro, R., Kataoka, K., Matsuda, K., Nara, M., Okano, T., Seike, M., Yoshimura, A., Kawakami, A., Uesaka, H., Nakae, H. and Kudoh, S.: Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model, *Mol. Cancer Ther.*, Vol. 7, No. 7, pp. 1923–1930 (2008).
- [22] Tang, Y. A., Wen, W. L., Chang, J. W., Wei, T. T., Tan, Y. H., Salunke, S., Chen, C. T., Chen, C. S. and Wang, Y. C.: A novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction, F-actin disruption and gene acetylation in lung cancer, *PLoS ONE*, Vol. 5, No. 9, p. e12417 (2010).
- [23] Lavergne, E., Hendaoui, I., Coulouarn, C., Ribault, C., Leseur, J., Eliat, P. A., Mebarki, S., Corlu, A., Clement, B. and Musso, O.: Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active -catenin, *Oncogene*, Vol. 30, No. 4, pp. 423–433 (2011).
- [24] Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A. and Aaronson, S. A.: Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling, *J. Biol. Chem.*, Vol. 274, No. 23, pp. 16180–16187 (1999).
- [25] Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. and Xu, J.: Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server, *Nat Protoc*, Vol. 7, No. 8, pp. 1511–1522 (2012).
- [26] Pierce, B. G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B. H., Vreven, T. and Weng, Z.: ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers, *Bioinformatics*, Vol. 30, No. 12, pp. 1771–1773 (2014).
- [27] Mashiach, E., Nussinov, R. and Wolfson, H. J.: FiberDock: a web server for flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 38, No. Web Server issue, pp. W457–461 (2010).
- [28] Takeda-Shitaka, M., Terashi, G., Chiba, C., Takaya, D. and Umeyama, H.: FAMS complex: a fully automated homology modeling system for protein complex structures, *Med Chem*, Vol. 2, No. 2, pp. 191–201 (2006).
- [29] Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B. and Lindahl, E.: GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, *Bioinformatics*, Vol. 29, No. 7, pp. 845–854 (2013).