

令和元年6月25日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16146

研究課題名（和文）がんのサブクローン構造を俯瞰的に攻略するための統計的解析手法の開発

研究課題名（英文）Statistical modeling for cancer sub-clonal evolution

研究代表者

松井 佑介（Matsui, Yusuke）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・准教授

研究者番号：90761495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、一検体のがんから複数の異なる部位の遺伝子変異を次世代シーケンサーを用いて調べることで、検体内においてサブクローンがどのような過程で進化したかを推定し、多数検体から得られるサブクローン進化の違いを定量化することで、対象群をがん進化の観点から特徴付けることを目的とした。今後データが増えていく中で、サブクローン進化構造の特徴に基づく患者の特徴付けを行い、臨床情報と組み合わせることにより治療抵抗性に関わるがんのサブクローン進化構造の同定が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一検体のがんから複数の異なる部位の遺伝子変異を次世代シーケンサーを用いて調べることで、検体内においてサブクローンがどのような過程で進化したかを推定し、多数検体から得られるサブクローン進化の違いを定量化することで、対象群をサブクローン進化の類似性に基づきクラスタリングする解析手法を開発した。数値シミュレーション実験でその有効性を検証したとともに、実際に8名の淡明細胞腎細胞がんおよび11名の非小細胞肺癌を本手法により解析した結果、同定したサブグループが再発性と薬剤感受性の特徴を持っていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to characterize the target group from the viewpoint of cancer evolution by estimating the process in which subclones evolved in a sample and quantifying the difference in subclone evolution obtained from a large number of samples by examining gene mutation of multiple different sites from a single cancer using a next-generation sequencer. As the data increase in the future, it is expected to identify the subclonal evolution structure of cancer related to resistance to treatment by characterizing patients based on the characteristics of the subclonal evolution structure and combining it with clinical information.

研究分野：生命情報学

キーワード：がんサブクローン進化 生命情報学 統計科学 木構造値データ解析 バイオインフォマティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がんは本来厳密な複製が求められる体細胞に遺伝子変異が蓄積した結果、細胞が異常に増殖することで発生する。この遺伝子変異の組み合わせは患者ごとに異なり(腫瘍間不均一性) また患者一人の中でも、異なる遺伝子変異の組み合わせをもつサブクローン<sup>1</sup>とよばれる細胞群が存在することが明らかとなっている(腫瘍内不均一性)。

がんの不均一性がどのようにして生じるのかという問いに答える一つのアプローチが、がんのクローン進化理論である。この理論はおよそ40年前に提唱され(Nowell 1976)、がんの発生とは逐次的な体細胞変異と体細胞分裂によるクローナルな増殖による進化過程であることが述べられている。Nowell によるがんクローン進化理論は、ダーウィンの進化論をがん細胞の集団に適用させたもので、ある腫瘍内において、がん細胞群が環境圧の変化に応じて、生存に対して選択的優位性をもつ変異(ドライバー変異)と中立的な変異(パッセンジャー変異)を新たに獲得し、生存に適するか否かの競合的選択に曝されることで、一部のサブクローンが自然淘汰され、異なるクローンとして進化していくというものである。臨床的な観点では、がんの治療抵抗性と再発性は同じ腫瘍に含まれる一部の抵抗性を示すサブクローンに一因があり、もともと少数であった抵抗性のサブクローンが、薬剤投与という環境変化に適応するために進化・増殖することで抵抗性を獲得すると考えられている。したがって、がん細胞群のサブクローン進化の特性を理解することは臨床的にも重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、一検体のがんから複数の異なる部位の遺伝子変異を次世代シーケンサーを用いて調べることで、検体内においてサブクローンがどのような過程で進化したかを推定し、多数検体から得られるサブクローン進化の違いを定量化することで、対象群をがん進化の観点から特徴付けることを目的とした。

## 3. 研究の方法

がんサブクローン進化推定手法の研究では、

(S1) 同一の遺伝的特徴をもつサブクローンおよびそれらの割合の推定

(S2) 推定したサブクローン間における進化構造の推定

を含む統計・数理的なアルゴリズムが開発されている。VAFを用いることで、同じ程度の変異をもつような細胞群の同定とそれらの割合を推定している点に違いがある。さらに、推定した細胞群間の進化上の順序を推定するために、以下の二つの仮定をおいている(Nik-Zainal et al. 2012; Beerenwinkel et al. 2015)。

(A1) 進化の過程で同じ変異は2回以上起こらない(Infinte site assumption)

(A2) 一度獲得した変異はそれ以降の進化の過程で失われない(No back mutation)

これらの仮定に従い、近年開発されている推定アルゴリズムを手法を実装した。

がんサブクローン進化構造を生物学的に解釈するには、個々のサブクローンに含まれている変異を解釈していくのが最も確実であると考えられるが、多数検体となった場合には困難である。本研究ではさらに、がんサブクローン構造を定量化することを考え、特に表現型とがんサブクローン進化構造の間の関連性を調べる手法を開発した。

## 4. 研究成果

サブクローン進化構造にはいくつかのパターンが知られており、Monoclonal、 polyclonal-low、 polyclonal-middle、 polyclonal-high、 mutator phenotype の5つがある(Yuan et al. 2016)。これらは進化構造のトポロジカルな特徴によって捉えることができるため定量化が可能である。さらに、Zhang et al.(2014)は肺腺がんのサブクローン進化を例に、再発と非再発の患者群で trunk と branch それぞれのサブクローンに蓄積されている変異数が大きく異なることを示した。

これらの研究を踏まえて、がんサブクローン進化構造の特徴を捉える特徴量として、進化系統樹のトポロジー構造<sup>8</sup>と各サブクローンに含まれる変異数の二つを考慮して分類する手法(phyC)を考案した(図1)。まず、phyCが扱う進化構造のモデルは、各点(ノード)がサブクローンを表し、トポロジーは進化構造を表す(図1A)。また、サブクローン同士をつなぐ線(エッジ)の長さは、親のサブクローンから子のサブクローンの間に新たに蓄積した変異の数を表す(図1B)。

木構造の比較では、数学的に取り扱いが容易な二分木を扱うことが多いが、サブクローン進化構造の場合は、先に示したように複雑な木の構造をとるため、患者間での木構造の比較は容易ではない。逆に、複雑な木構造を何らかの形で元の情報を失うことなく二分木に「変換」できれば、患者間でのがんサブクローン進化の比較が可能となる。phyCでは、参照木と呼ばれる共通の巨大な二分木を用意して、そこに患者ごとに推定された、がんサブクローン進化構造をマッピングする過程を通じて、「変換」を実現している。マッピングの際には、実際には分岐がない部分のエッジ長は「ゼロ」と考えることで、二分木以外の分岐構造を二分木に埋め込むことが可能である(図1C; 詳しいアルゴリズムと数理的な性質については Matsui et al. 2017 を参照)。このようにして共通の参照木に埋め込んだ二分木は、枝分かれのない部分のエッジ長はゼロ、枝分かれのある部分については対応するエッジ長のある、単純なエッジ長の組みとして定量的に表すことができる。さらに、患者間で同定される変異は異なるため、サブクローンに含まれる変異数を患者ごとの全変異数で正規化することで、エッジ長の比較を可能としている。これらを元に非類似性(距離)を計算することで、類似したがんサブクローン進化構造をグルーピングしている(図1D)。

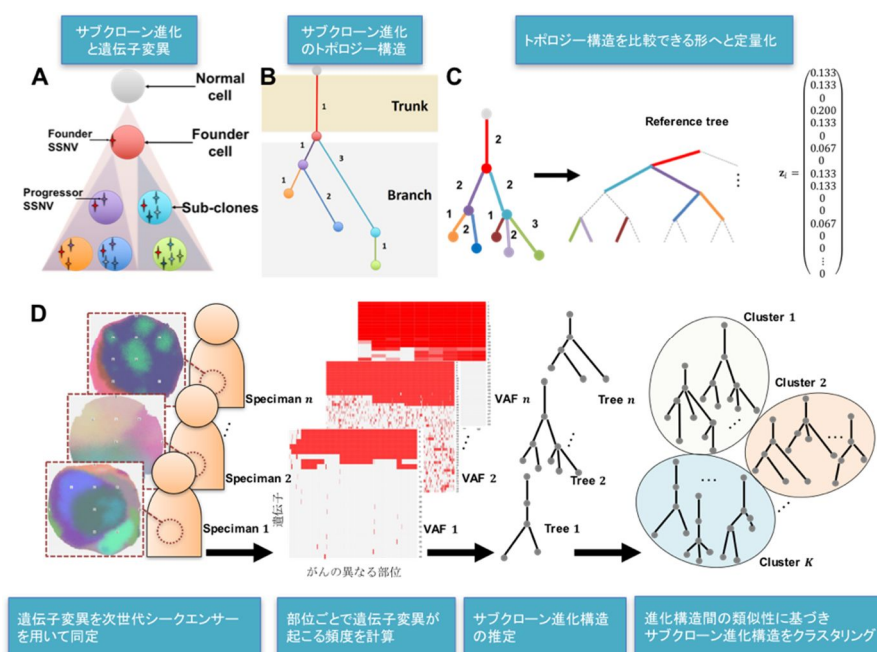
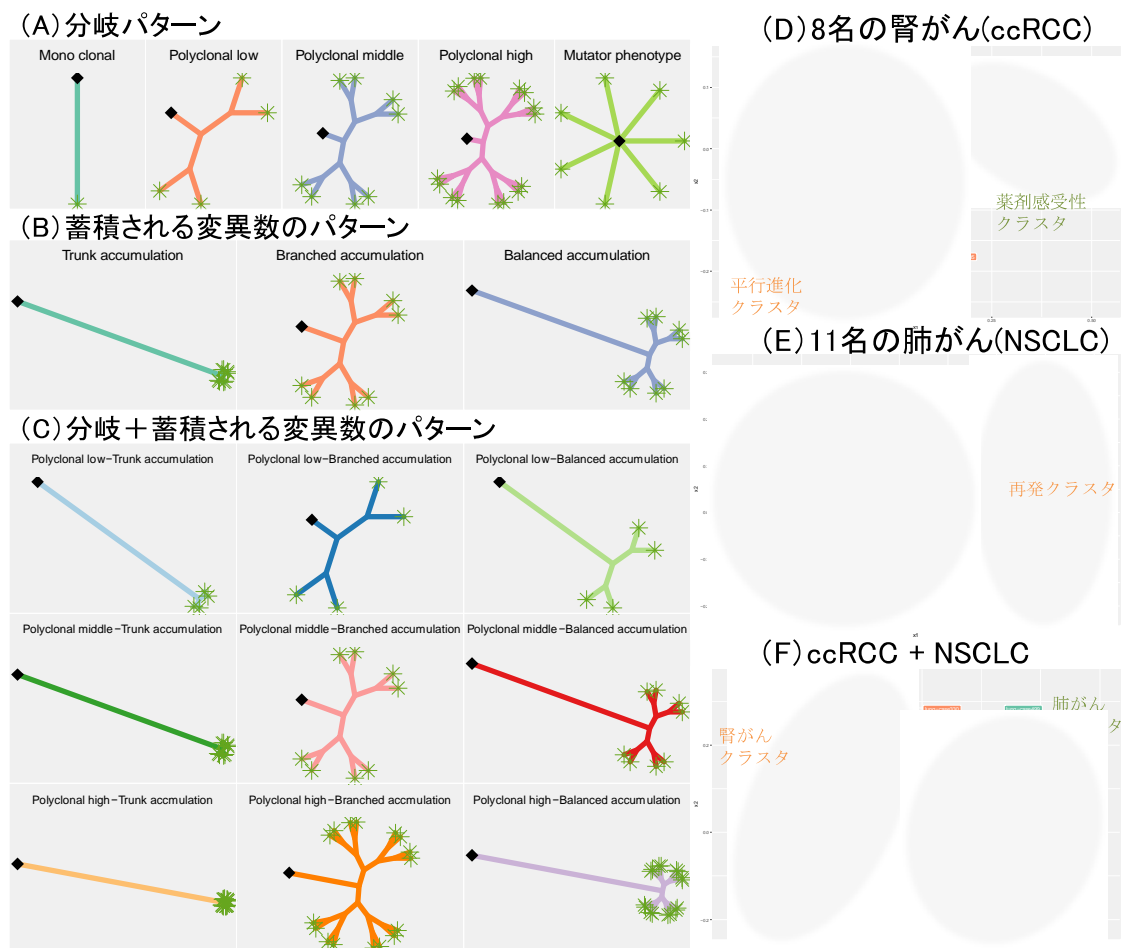


図1

図 2A に示した 5 つの分岐パターンの分類に加え、筆者らがサブクローンに含まれる変異数の特徴を考慮して (図 2B) 新たに定義したがんサブクローン進化構造の 9 つのパターン (図 2C) の分類についてのシミュレーションでは、十分な精度で分類できることを確認している (Matsui et al. 2017)。また、8 名の腎がん患者 (Gerlinger et al. 2014) および 11 名の肺線がん患者 (Zhang et al. 2014) に対する複数領域シーケンシングデータに対して、phyC を適用した結果を図 2D-F に示した。まず、腎がんでは、薬剤感受性患者群クラスターが形成され (図 2D)、さらに肺線がんでは、再発群と非再発群でがんサブクローン進化構造分かれていることがわかる (図 2E)。さらに二つのがん種間で進化構造の差異が確認できる (図 2F)。このように、がんサブクローン進化構造をトポロジーに基づいて分類することで、大まかな特徴を捉えることができ、今後データが増えていく中で、サブクローン進化構造の特徴に基づく患者の特徴付けを行い、臨床情報と組み合わせることにより治療抵抗性に関わるがんのサブクローン進化構造の同定が期待できる。



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Saito T, Niida U, Uchi R, Hirata H, Komatsu H, Sakimura S, Hayashi S, Nambara S, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Masuda T, Sugimachi K, Tobo T, Nishida H, Daa T, Chiba K, Shiraishi Y, Yoshizato T, Kodama M, Okimoto T, Mizukami K, Ogawa R, Okamoto K, Shuto M, Fukuda K, **Matsui Y**, Shimamura T, Hasegawa T, Doki Y, Nagayama S, Yamada K, Kato M, Shibata T, Mori M, Aburatani H, Murakami K, Suzuki Y, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. A temporal shift of the evolutionary principle shaping intratumor heterogeneity in colorectal cancer. Nat Commun. 2018 Jul 23;9(1):2884. doi: 10.1038/s41467-018-05226-0. (査読付き)
2. Takeda M, Kanki Y, Masumoto H, Funakoshi S, Hatani T, Fukushima H, Izumi-Taguchi A, **Matsui Y**, Shimamura T, Yoshida Y, Yamashita JK. (2018) Identification of Cardiomyocyte-Fated Progenitors from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Marked with CD82. Cell Rep;22(2):546-556. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.057. (査読付き)

3. Terai H, Kitajima S, Potter DS, **Matsui Y**, Gutierrez Quiceno L, Chen T, Kim TJ, Rusan M, Thai TC, Piccioni F, Donovan KA, Kwiatkowski N, Hinohara K, Wei G, Gray NS, Fischer ES, Wong KK, Shimamura T, Letai A, Hammerman PS, Barbie DA. (2017) ER stress signaling promotes the survival of cancer 'persister cells' tolerant to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res.* pii: canres.1904.2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1904. (査読付き)
4. **Matsui Y**, Niida A, Uchi R, Mimori K, Miyano S, Shimamura T (2017) phyC:Clustering cancer evolutionary trees. *PLoS Comput Biol* 13(5): e1005509. (査読付き)
5. Nakaoka H.J, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, **Matsui Y**, Shimamura T, Sato H, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. (2016) NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumorigenicity of Cancer Cells. *Sci Rep.* 7;622784. (査読付き)
6. **Matsui Y**, Mizuta M, Ito S, Miyano S, and Shimamura T. (2016) D3M: Detection of differential distributions of methylation levels. *Bioinformatics.* Btw138: 1-8. (査読付き)

〔学会発表〕(計 8 件)

〔国際学会発表〕

1. **Matsui Y**, Niida A, Uchi R, Mimori K, Miyano S and Shimamura T. Clustering cancer evolutionary trees. 2016.12.9-11. ERCIM2016 Seville Spain.
2. **Matsui Y** and Shimamura T. Clustering cancer evolutionary trees. The MBI Workshop on Models for Oncogenesis, Clonality, and Tumor Progression. 2016.9.26-30. Ohio, U.S.A.

〔国際学会・セッション構成〕

3. **Matsui Y**, Shiraishi Y, Nakatochi M (Organizers). The cutting edge of biomedical big data - from bioinformatic methodologies to data analysis. Special session of Conference of the International Federation of Classification Societies 2017 (IFCS 2017). 2017.8.8-10 Tokai University Takanawa campus, Tokyo.

〔国内学会発表(招待講演)〕

4. **松井佑介**. (2018)がんの複雑性と進化を読み解くデータ科学駆動型アプローチ. 科研費シンポジウム「生命・自然科学における複雑現象解明のための統計的アプローチ」2018.2.16-17. 滋賀大学.
5. **松井佑介**, 宮野悟, 島村徹平. (2017) がん細胞の特性に基づくサブクローン進化構造の統計的推定手法の開発. 第6回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP 2017) BoF 企画セッション「異分野融合研究によるがんの進化の理解」, 2017.9.27-29, 北海道大学
6. **松井佑介**, 宮野悟, 島村徹平 (2016) 木構造値データの分類手法とがん進化系統樹への応用. 統計関連学会連合大会 2016 企画セッション「分類理論の最前線」2016. 9.4-7 金沢大学.

〔図書〕(計 1 件)

**松井佑介**・島村徹平(2018) 遺伝統計学と疾患ゲノムデータ解析 : 病態解明から個別化医療, ゲノム創薬まで. メディカルドゥ(分担執筆).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

プレスリリース:

[http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload\\_images/20170516\\_med\\_1.pdf](http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20170516_med_1.pdf)

6. 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。