

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04992

研究課題名（和文）1細胞がん-間質相互作用解析による抗癌剤耐性克服ターゲットの探索

研究課題名（英文）Single cell interactome analysis for the discovery of targets to overcome anti-cancer drug resistance.

研究代表者

河村 大輔 (Komura, Daisuke)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：10776082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,700,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍組織のシングルセルトランスクリプトームシーケンスのデータから、癌細胞や線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞といった各種細胞との間における細胞間相互作用全体（インタラクトーム）を解析・可視化する手法を開発した。この方法を用いてびまん型胃癌モデルマウスおよび利用可能なヒトの正常胃粘膜と胃癌組織のシングルセルシーケンスデータのインタラクトーム解析を行った。その結果、線維芽細胞を始めとして様々な細胞からのシグナルががんの進展に寄与している可能性が示唆された。また、これらの中には抗癌剤の効果減弱に関係するとの報告がある分子も含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は通常それ単独では生存できず、周囲のさまざまな細胞と相互作用することによって生存に有利な状況を作り出している。近年組織における遺伝子発現量を一細胞レベルで定量化する技術が開発された。本研究ではこのデータを用いてがん細胞と周囲の非がん細胞との間の相互作用を定量化・可視化する技術を開発した。本手法をマウスのがん組織やヒトの正常組織、がん組織に適用したところ、正常組織からがん組織に至る過程で重要な相互作用を明らかにした。また、その中には抗がん剤の効果をも弱める可能性のある分子も含まれていた。本研究成果をさらに進めることでがんの本体解明や抗癌剤耐性獲得の機序解明などにつながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：From single-cell transcriptome data of tumor tissues, we developed a method to analyze and visualize the entire cell-cell interaction (interactome) between various cells such as cancer cells, fibroblasts, immune cells, and vascular endothelial cells. Using this method, we performed interactome analysis of single-cell transcriptome data of normal gastric mucosa and gastric cancer tissues from human samples, and gastric cancer tissues from the mouse model of diffuse-type gastric cancer. The results suggest that signals from various cells, including fibroblasts, may contribute to the progression of cancer. These included molecules that have been reported to be associated with attenuated effects of anticancer drugs.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：がん 治療標的 ゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞はそれ単独での生存は難しく、生体内では常に周囲に存在する線維芽細胞・血管内皮・炎症細胞などの間質細胞からの支持シグナルを受け、また逆にがん細胞自身がシグナルを出して生存に適した間質細胞を誘導している。近年、抗がん剤治療によってがん細胞・間質細胞間相互作用に生じる変化が抗がん剤の耐性獲得に関与していることが明らかになりつつある。分子標的薬の1つである EGFR 阻害剤の耐性における HGF-MET の活性化や、5-FU による骨髄由来の内皮前駆細胞の誘導に伴う血管新生能の亢進がその例である。高頻度に遺伝子変異を起こし適応するがん細胞に比べ、間質は適応メカニズムが限られるため抵抗性を生じにくいことが期待され、間質をターゲットとした耐性解除は、長期に渡って持続する非常に有効な戦略となる可能性がある。しかし、これらの耐性獲得メカニズムをシステムレベルで理解し、耐性を克服するためのターゲット分子を同定するためには、がん-間質の細胞間相互作用の包括的プロファイルや、個別の相互作用間での定量的比較を行う技術が必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

我々はマウスに移植したヒトがん Xenograft 系において、並列型シーケンサーを用いて全トランスクリプトームシーケンスを行いがん細胞-間質細胞を包括的かつ定量的に解析する方法を開発してきた。シーケンシングデータからマウス由来 RNA とヒト由来 RNA との配列を高精度に分離して発現プロファイリングを行いタンパク質相互作用のデータベースと統合することによりヒト由来がん細胞-マウス由来間質細胞間の相互作用全体(インターラクトーム)を包括的に解析する技術である。本手法により多種の既知の相互作用についてその活性と相互依存性を定量的に解析することが可能となった。

本研究では我々が開発したインターラクトーム解析技術と一細胞(シングルセル)トランスクリプトーム技術とを組み合わせることで、がん細胞と間質の各種細胞間との相互作用全体を個別に解析する手法(シングルセル・インターラクトーム解析)を新規に開発する。また、患者がん組織からマウス内に直接移植された PDX(Patient-Derived Xenograft)モデルなどに本手法を適用し、癌の発生、進展に寄与する相互作用や、抗がん剤耐性獲得に寄与する間質の細胞種および重要な相互作用の同定を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) シングルセルトランスクリプトームデータを用いたインターラクトーム解析技術の開発

我々が開発した細胞間相互作用全体(インターラクトーム)解析をシングルセル・トランスクリプトームに対応させるため、アルゴリズムの改良を行う。具体的には、各細胞の発現プロファイルを作成し、それをマーカーの発現量及び、クラスタリングアルゴリズムを用いて、各細胞種に分類する。それぞれの細胞種について、個別にインターラクトームプロファイルを構築する。また、複数のプロファイル間でインターラクトームプロファイルを比較するため、細胞種が多い場合に大きく変化が生じている相互作用をシグナルの強さの変化、相互作用において果たす役割(腫瘍から間質へのシグナルから、間質から腫瘍へのシグナル変化など)の変化の大きさを可視化しランク付けを行う手法を新たに開発する。

#### (2) インターラクトーム解析技術を用いた腫瘍組織のシングルセルトランスクリプトームプロファイル解析

開発した手法および公開されている細胞間相互作用解析手法を用いて、正常組織やがん組織に適用し、インターラクトームプロファイルの解析を行う。癌の発生、進展に寄与する相互作用や、

抗がん剤耐性獲得に寄与する間質の細胞種および重要な相互作用の同定を行う。また、それらの中から抗がん剤耐性に関与する分子・相互作用の探索を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) シングルセルトランスクリプトームデータを用いたインタラクトーム解析技術の開発

腫瘍組織のシングルセルトランスクリプトームシーケンスのデータから、癌細胞や線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞といった各種間質細胞との間における細胞間相互作用全体（インタラクトーム）を解析・可視化する手法を開発した。

本手法は以下の3ステップで行われる。A) 現在主流となっているドロップレットを用いたシングルセル単離システムで解析されたシングルセルトランスクリプトームデータにはambient RNAと呼ばれる細胞外RNA成分が混入し、これが解析の精度を低下させていることがわかった。そのため、ambient RNA成分を推定・除去する手法を適用し、ノイズの少ない発現プロファイルを構築する。B) クラスタリングとマーカー遺伝子を用いて細胞種の同定を行った。必要に応じて細胞種ごとにクラスタリングを行い、subpopulationの同定も行う。C) 我々が独自に構築した高精度のリガンド・レセプターデータベースと併せることにより、細胞間のリガンド・レセプターを介する相互作用の強さをスコア化・可視化する。

我々は上記の処理を行うパイプラインを構築し、インタラクトームプロファイルを定量化・可視化するWebサーバを開発した。本Webサーバには相互作用のパターン（相互作用が生じている細胞の種類と相互作用の強さ）による相互作用のクラスタリングや、細胞間で生じる相互作用の向き（autocrineなど）の可視化機能も実装した。

##### (2) インタラクトーム解析技術を用いた腫瘍組織のシングルセルトランスクリプトームプロファイル解析

次に、これまでの研究で開発した手法および公開されている細胞間相互作用解析手法を用いて、正常組織からがん組織に至る変化に特徴的なインタラクトームプロファイルの解析を行った。対象は当初はPDX(Patient-Derived Xenograft)を予定していたが、検討の結果PDXに比べ免疫環境がより臨床検体に近いびまん型胃がんモデルマウス、および利用可能なヒトの正常胃粘膜、胃癌組織とした。なお、解析の際、びまん型胃がんでは癌細胞と正常胃粘膜の発現プロファイルが極めて類似しているため、発現プロファイルのみから癌細胞を正確に同定することが困難であることが明らかとなった。そのため、同じサンプルのゲノムシーケンスデータを用いることで癌細胞を正確に同定することが可能となった。解析の結果、びまん型胃がんモデルマウスおよびヒト臨床検体において、線維芽細胞を始めとして様々な細胞からのシグナルががんの進展に寄与している可能性が示唆された。また、これらの中には抗がん剤の効果減弱に関係するとの報告がある分子も含まれていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroshima Yukihiko, Kasajima Rika, Kimura Yayoi, Komura Daisuke, Ishikawa Shumpei, Ichikawa Yasushi, Bouvet Michael, Yamamoto Naoto, Oshima Takashi, Morinaga Soichiro, Singh Shree Ram, Hoffman Robert M., Endo Itaru, Miyagi Yohei	4. 巻 469
2. 論文標題 Novel targets identified by integrated cancer-stromal interactome analysis of pancreatic adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 217 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.031">https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.031</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohkuma Ryotaro, Yada Erica, Ishikawa Shumpei, Komura Daisuke, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 High expression of olfactomedin-4 is correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0226707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226707">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226707</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 古久保宙希、河村大輔、加藤洋人、石川俊平
2. 発表標題 Single-cell transcriptomics of a model mouse for diffuse-type gastric cancer reveal ligand-receptor interactions potentially important for the cancer development
3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣島，幸彦；笠島，理加；木村，弥生；河村，大輔；石川，俊平；市川，靖史；遠藤，格；宮城，洋平
2. 発表標題 膵癌における包括的癌-間質インタラクトーム解析
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Menghua Zhang, Itsuki Sugita, Daisuke Komura, Shunpei Ishikawa
2. 発表標題 The genomic profile of metastatic diffuse-type gastric cancer in Cdh1loxP/loxP; Trp53loxP/loxP double conditional knockout mice
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Menghua Zhang, Itsuki Sugita, Daisuke Komura, Shunpei Ishikawa
2. 発表標題 The genomic profile of metastatic diffuse-type gastric cancer in Cdh1loxP/loxP; Trp53loxP/loxP double conditional knockout mice
3. 学会等名 第90回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Komura, Ryohei Suzuki, Shumpei Ishikawa
2. 発表標題 Visualizing ligand-receptor-mediated interactome in single cell transcriptome data
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Systems Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shumpei Ishikawa, Daisuke Komura, Ryohei Suzuki, Hiroto Katoh
2. 発表標題 Interactome analysis of gastric cancer microenvironment by single-cell transcriptome sequencing
3. 学会等名 Cell Symposia. Single Cells: Technology to Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroto Katoh, Daisuke Komura, Shumpei Ishikawa.
2. 発表標題 Single cell analysis for the human gastric cancer environments
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Single Cell Analyses (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河村大輔, 鈴木良平, 加藤洋人, 山本尚吾, 油谷浩幸, 石川俊平
2. 発表標題 治療標的探索のためのがん-間質細胞間相互作用の網羅的解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Komura, Takayuki Isagawa, Ryohei Suzuki, Reiko Sato, Mariko Tanaka, Shogo Yamamoto, Masashi Fukayama, Hiroyuki Aburatani, Shumpei Ishikawa.
2. 発表標題 CASTIN: a system for comprehensive analysis of cancer-stromal interactome.
3. 学会等名 The 12th International Workshop on Advanced Genomics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河村大輔, 砂河孝行, 鈴木良平, 佐藤玲子, 加藤洋人, 田中麻理子, 山本尚吾, 深山正久, 油谷浩幸, 石川俊平
2. 発表標題 治療標的探索のためのがん-間質細胞間相互作用解析システム
3. 学会等名 第106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田 随象(編集)、河村大輔ら	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 264
3. 書名 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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----