

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06198

研究課題名(和文) 臨床検体の遺伝子発現情報を用いた仮想ダイセクション手法の開発とデータベース構築

研究課題名(英文) Development and its application of the "virtual dissection" method using gene expression profiles of clinical specimens

研究代表者

茂榎 薫 (Mogushi, Kaoru)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60569292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ヒト臨床検体(正常・炎症・癌組織)の遺伝子発現情報から、組織内に含まれる細胞群の混合率を推定するアルゴリズムを開発する。そこで、細胞種が混在した正常・炎症・癌などの組織の発現パターンを公共データベースから入手し、機械学習の一つである「教師なし学習」を用いて、各細胞群のリファレンスとなる発現パターン(リファレンス発現パターン)とそれらの混合比を検体ごとに推定する。さらにリファレンス発現パターンを用いて、新規に得られた検体の発現プロファイルに対して細胞群の混合比を算出し、研究者に提示するようなシステムの構築を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ではシングルセル解析技術の進展がめざましく、本研究でゴールとした細胞集団の同定や比率推定などが実験的に可能になりつつある。しかしながらシングルセル解析にはバルク解析よりコストが掛かることや、すでに公開データベースに蓄積された臨床検体のバルクRNA-seqデータやマイクロアレイによる発現プロファイルの再解析により既存検体の細胞集団の推定が可能になることで、シングルセル解析で得られる情報と相補的に活用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we designed a novel algorithm to estimate ratios of cells in a tissue by deconvolution of bulk expression profiles into each type of cells including normal, inflammatory, and / or tumor cells. The expression profiles of those mixture of cells were obtained from public databases and were used to investigate the reference expression patterns of major types of cells in several cancers including hepatocellular carcinoma, lung cancer, and breast cancer. Furthermore, we aimed to develop a system to provide the estimated ratio of cells from given expression profiles.

研究分野：臨床バイオインフォマティクス

キーワード：バイオインフォマティクス 仮想ダイセクション法 教師なし学習 遺伝子発現解析

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

手術や生検で得られる臨床検体は一般的にいくつかの種類 of 細胞種が混じった組織であり、遺伝子やタンパク質の発現解析を行う場合には、前提として組織全体での発現量を扱うことになる。そのため細胞種ごとの発現量を直接的に測定したい場合には、顕微鏡視野下で目的の細胞を取り分けるレーザーキャプチャーマイクロダイセクションや、蛍光色素などを用いて微小流路中で目的の細胞を選択的に定量・回収するフローサイトメトリー等で、対象とする細胞を実験的に回収することがしばしば行われるが、時間や労力、コストが掛かることが問題点として挙げられる。

一方、近年では仮想ダイセクション法(virtual dissection)やインシリコ・フローサイトメトリー(in silico flow cytometry)と呼ばれる、細胞種が混合した発現データから計算的に元の細胞種の比率を推定する方法が研究されている(図 1)。たとえば癌の研究分野であれば、手術検体の組織の発現パターンから、実質細胞・癌細胞・間質細胞(免疫細胞や線維芽細胞、内皮細胞などを含む)を計算により元の発現パターンを分離(deconvolution)する、UNDO、DeMix、ESTIMATEなどのソフトウェアが発表されている。また免疫細胞においても、M1/M2 マクロファージやNK細胞、細胞傷害性T細胞などを分離するような方法(CYBERSORT など)が提案されている。

しかし、仮想ダイセクション法の現状の課題点としては、各細胞種を規定するリファレンス・パターンが少ないことが挙げられる。たとえばCYBERSORTでは22種類のリンパ球のマーカー遺伝子を提供しているが、それ以外の組織に対して細胞ごとの発現パターンを分離・推定したい場合には研究者がリファレンス・パターンを準備する必要がある。このような現状のため、現時点では癌研究において仮想ダイセクション法が有効に利用できるとは言い難い。

TCGA や NCBI GEO などの公共データベースには、癌をはじめとするさまざまな疾患および生命現象の遺伝子発現情報が蓄積されている。しかしながら、同じ癌の組織であっても患者ごとに癌細胞・間質細胞・免疫細胞等が含まれる割合が異なる。免疫染色などで病理組織を細かく確認することで、これらの細胞の割合を測定することも原理的には可能であるが、病理検体とRNA抽出に用いた組織が物理的に離れている場合も少なくない。したがって、得られた発現データに重畳されているはずの個々の細胞種の割合を、あらかじめ求めたリファレンス・パターンと仮想ダイセクションにより正確に推定することが可能になれば、既存の発現データを再解析するだけで、癌と間質の相互作用解析や、浸潤した免疫細胞の個人差の解析など、今まででは困難と思われていた研究の実現が期待される。

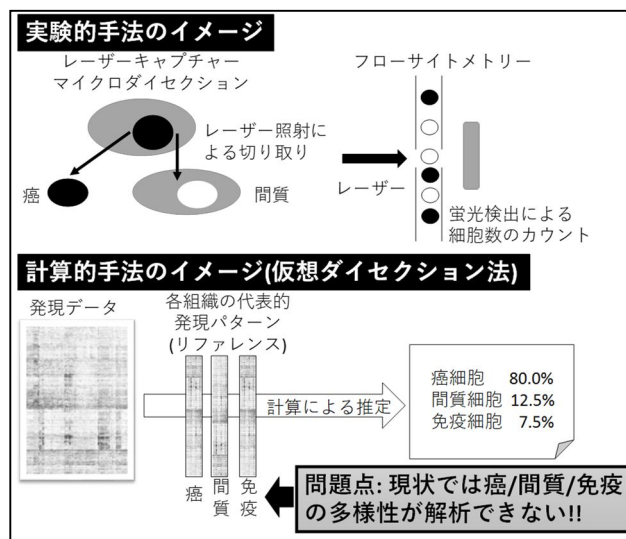


図 1. 研究開始当初での仮想ダイセクション法による問題解決の模式図

2. 研究の目的

本課題では、(1) 細胞種ごとのリファレンス・パターンのデータベース提供、(2) リファレンス・パターンを活用した細胞種の混合比の正確な推定アプリケーションの提供、を実現する。さらに、癌の微小環境の相互作用解析や、間質細胞の個人差を正確に解析するデータベースとツールを整備することで、将来的にマーカー探索や創薬シーズ開発の基盤として医療に還元することを目指す。

3. 研究の方法

まず、アルゴリズムの方向性や前処理のパラメーターの評価・検討を行うため、既知の割合で混合したラット組織の公開発現データによる予備解析を実施した。その際、当初想定していた非負値行列因子分解(NMF)のみならず、非負値主成分分析(nsprcomp)や非負値スパース累積主成分分析(nscumcomp)などの類似手法による追加検討を行った。また、TCGA (The Cancer Genome Atlas)にて公開されている肝細胞癌、乳癌、肺癌などの RNA-seq の発現情報を用いて、それぞれのがん種における細胞種の共通パターン推定を行った。また、それぞれのリファレンス発現パターンの生物学的意義の解釈を進めるとともに、がん横断的な類型パターンの収集とカタログ化を目指した。これらのソフトウェアのクラウド環境への移行を実施し、評価を進めた。

4. 研究成果

2018 年度では、おもに細胞種の混合率を推定するアルゴリズムの検討を行った。本研究では公開された RNA 発現データを使用するが、公開データのヒト臨床検体では細胞種の混合率の情報を得ることが困難である。そのため、あらかじめ混合率が分かっているデータをもとに、予備解析と評価を進めた。

2019 年度は、TCGA (The Cancer Genome Atlas)に収載されている肝細胞癌、乳癌、肺癌の RNA-seq による発現データを用いて、それぞれのがん組織に含まれている細胞種のリファレンス発現パターンの収集を進めた。nsprcomp と NMF の 2 つの手法を用いて検討を進めており、大別すると(A) 組織ごとの正常細胞由来と考えられる発現パターン、(B) 腫瘍細胞由来と考えられる細胞周期関連遺伝子の亢進を含むリファレンス発現パターンと、(C) 免疫細胞由来と考えられる炎症系の遺伝子群の亢進を含むリファレンス発現パターン、の 3 つの主要なパターンとなっている。また、安定的に見いだされる各細胞に固有の発現パターンであるリファレンス発現パターンの収集・分類とカタログ化について検討した。

2020 年度はこれらのスケールアウトを目指し、Google Cloud Computing (GCP)のクラウド環境への移行と評価を行った。必要な R パッケージの導入や、仮想 CPU 数や必要メモリなどの検討を行うとともに、接続元 IP アドレス制限などについても対策を実施した。なお、本課題で扱う範囲の臨床検体のデータはすべて公開データであるため、クラウド以降にあたっての倫理面での問題は発生しない。また、引き続き TCGA の RNA-seq データを用い、各細胞に固有の発現パターンであるリファレンス発現パターンの収集・分類とカタログ化の検討を進めた。

2021 年度は精度向上を目的とし、nsprcomp や NMF の代わりに深層学習の手法を取り入れ、オートエンコーダーによる細胞種の混合比の推定方法に関する検討も実施した。混合比は非負の値となるため、各ウェイトの係数は非負の制約のもとで推定を行った。現段階では nsprcomp や NMF と比べると十分な定量性は得られないことやパラメーター推定に時間が掛かるなどの原因で解析アルゴリズムとして採用は難しい段階であるが、引き続き評価・開発を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 OKAZAKI MISATO, MOGUSHI KAORU, DENDA-NAGAI KAORI, FUJIHIRA HARUHIKO, NOJI MIKI, ISHII-SCHRADE KATRIN, SAKATA-MATSUZAWA MADOKA, NAKAI KATSUYA, HORIMOTO YOSHIYA, SAITO MITSUE, IRIMURA TATSURO	4. 巻 41
2. 論文標題 Biological and Clinicopathological Implications of Beta-3-N-acetylglucosaminyltransferase 8 in Triple-negative Breast Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 845 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14837	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 -
1. 著者名 Takakuwa Kazuya, Mogushi Kaoru, Han Min, Fujii Tomoaki, Hosoya Masaki, Yamanami Arina, Akita Tomomi, Yamashita Chikamasa, Hayashida Tetsu, Kato Shunsuke, Yamaguchi Shigeo	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel diagnostic system to evaluate epidermal growth factor receptor impact as a prognostic and therapeutic indicator for lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63200-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Fumi, Tsuboi Yumi, Takahashi Yuka, Horimoto Yoshiya, Mogushi Kaoru, Ito Takeshi, Emi Mitsuru, Matsubara Daisuke, Shibata Tatsuhiro, Saito Mitsue, Murakami Yoshinori	4. 巻 112
2. 論文標題 Short somatic alterations at the site of copy number variation in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 444 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14630	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 -
1. 著者名 OKAZAKI MISATO, MOGUSHI KAORU, DENDA-NAGAI KAORI, FUJIHIRA HARUHIKO, NOJI MIKI, ISHII-SCHRADE KATRIN, SAKATA-MATSUZAWA MADOKA, NAKAI KATSUYA, HORIMOTO YOSHIYA, SAITO MITSUE, IRIMURA TATSURO	4. 巻 41
2. 論文標題 Biological and Clinicopathological Implications of Beta-3-N-acetylglucosaminyltransferase 8 in Triple-negative Breast Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 845 ~ 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14837	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 -

1. 著者名 Nakayama S, Shimonaka S, Elahi M, Nishioka K, Oji Y, Matsumoto SE, Li Y, Yoshino H, Mogushi K, Hatano T, Sato T, Ikura T, Ito N, Motoi Y, Hattori N.	4. 巻 84
2. 論文標題 Tau aggregation and seeding analyses of two novel MAPT variants found in patients with motor neuron disease and progressive parkinsonism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 240.e13 ~ 240.e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.016	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 -

1. 著者名 Horimoto Y, Terao T, Tsutsumi Y, Tanabe M, Mogushi K, Hlaing MT, Sasaki R, Saeki H, Okazaki M, Sonoue H, Arakawa A, Saito M.	4. 巻 43
2. 論文標題 Estrogen Receptor-positive Ductal Carcinoma In Situ Frequently Overexpresses HER2 Protein Without Gene Amplification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001300	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 -

1. 著者名 Sugizaki T, Tanaka KI, Asano T, Kobayashi D, Hino Y, Takafuji A, Shimoda M, Mogushi K, Kawahara M, Mizushima T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Idebenone has preventative and therapeutic effects on pulmonary fibrosis via preferential suppression of fibroblast activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-019-0226-y	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 -

1. 著者名 Nakazato K, Mogushi K, Kayamori K, Tsuchiya M, Takahashi KI, Sumino J, Michi Y, Yoda T, Uzawa N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Glucose metabolism changes during the development and progression of oral tongue squamous cell carcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1372-1380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10420	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 -

1. 著者名 Matsumura Y, Ito Y, Mezawa Y, Sulidan K, Daigo Y, Hiraga T, Mogushi K, Wali N, Suzuki H, Itoh T, Miyagi Y, Yokose T, Shimizu S, Takano A, Terao Y, Saeki H, Ozawa M, Abe M, Takeda S, Okumura K, Habu S, Hino O, Takeda K, Hamada M, Orimo A.	4. 巻 2
2. 論文標題 Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial?mesenchymal plasticity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 240.e13-240.e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Shu, Mogushi Kaoru, Akiyama Yoshimitsu, Furuyama Takaki, Watanabe Shuichi, Ogura Toshio, Ogawa Kosuke, Ono Hiroaki, Mitsunori Yusuke, Ban Daisuke, Kudo Atsushi, Arie Shigeki, Tanabe Minoru, Wands Jack R., Tanaka Shinji	4. 巻 40
2. 論文標題 Comprehensive molecular and immunological characterization of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 457 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.12.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chiyonobu Norimichi, Shimada Shu, Akiyama Yoshimitsu, Mogushi Kaoru, Itoh Michiko, Akahoshi Keiichi, Matsumura Satoshi, Ogawa Kosuke, Ono Hiroaki, Mitsunori Yusuke, Ban Daisuke, Kudo Atsushi, Arie Shigeki, Suganami Takayoshi, Yamaoka Shoji, Ogawa Yoshihiro, Tanabe Minoru, Tanaka Shinji	4. 巻 188
2. 論文標題 Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) Overexpression in Intratumoral Hepatic Stellate Cells within Hepatocellular Carcinoma with Metabolic Risk Factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1213 ~ 1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.01.012	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 -

1. 著者名 Sunakawa Yu, Mogushi Kaoru, Lenz Heinz-Josef, Zhang Wu, Tsuji Akihito, Takahashi Takehiro, Denda Tadamichi, Shimada Ken, Kochi Mitsugu, Nakamura Masato, Kotaka Masahito, Segawa Yoshihiko, Tanioka Hiroaki, Negoro Yuji, Moran Miriana, Astrow Stephanie H., Hsiang Jack, Stephens Craig, Fujii Masashi, Ichikawa Wataru	4. 巻 17
2. 論文標題 Tumor Sidedness and Enriched Gene Groups for Efficacy of First-line Cetuximab Treatment in Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 2788 ~ 2795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-18-0694	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 -

1. 著者名 Suehara Yoshiyuki, Akaike Keisuke, Mukaihara Kenta, Kurisaki-Arakawa Aiko, Kubota Daisuke, Okubo Taketo, Mitomi Hiroyuki, Mitani Keiko, Takahashi Michiko, Toda-Ishii Midori, Kim Youngji, Tanabe Yu, Takagi Tatsuya, Hayashi Takuo, Mogushi Kaoru, Kaneko Kazuo, Yao Takashi, Saito Tsuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 KCTD12 is negatively regulated by Kit in gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 27016 ~ 27026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horimoto Yoshiya, Tanabe Masahiko, Kazuno Saiko, Miura Yoshiki, Mogushi Kaoru, Sonoue Hiroshi, Arakawa Atsushi, Kajino Kazunori, Kobayashi Toshiyuki, Saito Mitsue	4. 巻 8
2. 論文標題 Elucidation of inhibitory effects on metastatic sentinel lymph nodes of breast cancer during One-Step Nucleic Acid Amplification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25911-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学 研究者情報データベース https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=5240</p>

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
研究分担者	島田 周 (Shimada Shu) (20609705)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------