

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22918

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーによる経時的解析を統合した腫瘍への組織特異的選択圧の探索

研究課題名（英文）Exploration of tissue-specific selective pressure on tumors; integration of time-course analysis by liquid biopsy

研究代表者

生島 弘彬 (IKUSHIMA, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80719154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：多発転移を有する肺癌患者において、組織毎に異なる選択圧が腫瘍細胞にかかる結果、組織毎に異なったheterogeneityが存在し、生体全体としてみるとそれが治療応答性に大きな影響を与えていることが、本研究者のこれまでの研究で明らかとなっている。本研究では、肺癌細胞にheterogeneityを与える機序の一つとして上皮間葉転換に着目し、細胞レベルでの（すなわち、集団内の構成配分変化だけではない）上皮間葉転換の詳細を明らかにするために、単一細胞遺伝子発現解析の技術を用いて、上皮間葉転換の中間段階の実態を捉え、さらに機械学習を組み合わせることで、肺癌患者の予後予測へ結びつけるモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌の多発転移では転移組織毎にわずかに性状の異なった細胞集団が存在し、生体全体としてみるとそれが治療応答性に大きな影響を与えていることが、本研究者のこれまでの研究で明らかとなっている。本研究では、正常肺組織からの単一細胞遺伝子発現データを用いて、上皮系・間葉系の発現プロファイルに対する機械学習を行い、それを肺癌組織の遺伝子発現データに適用することで、各肺癌組織が上皮間葉転換のどのような段階にあるかを判定するモデルを構築した。正常肺からの単一細胞遺伝子発現データに基づく腫瘍細胞の遺伝子発現パターンの解析は、肺癌患者の予後予測に有益な情報をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been shown in our previous studies that tumor cells are subjected to different selection pressures in each tissue in lung cancer patients with multiple metastases, resulting in different heterogeneity in each tissue, which has a significant impact on treatment responsiveness in a body as a whole. In this study, we focused on epithelial-mesenchymal transition as one of the mechanisms that confer heterogeneity to lung cancer cells. To clarify the details of epithelial-mesenchymal transition at the cellular level (i.e., not only the change in compositional allocation within a cell population), we used single-cell gene expression analysis technology to capture the intermediate stage of epithelial-mesenchymal transition. We have developed a model to predict prognosis of lung cancer patients by combining single-cell gene expression analysis with machine learning.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

これまでの様々な研究により、一患者における癌細胞集団は決して均一な集団ではなく *heterogenous* な集団であることが明らかとなっており (McGranahan and Swanton, *Cancer Cell* 2015;27:15-26; Jamal-Hanjani *et al*, *N Engl J Med*, 2017;376:2109-21)、さらにそこに、癌細胞自身の増殖速度、免疫応答や間質組織を始めとする周囲環境との相互作用、等の様々な「選択圧」が加わることで、*heterogenous* な集団の構成がダイナミックに変化していることが明らかとなっている (Hanahan and Weinberg, *Cell*, 2011;144:646-74; Burrell and Swanton, *Mol Oncol*, 2014;8:1095-111)。また、その *heterogeneity* は、発癌段階だけでなく、その後の薬剤や放射線による治療介入によっても刻々と変化し (Misale *et al*, *Cancer Discov.* 2014;4:1269-80; Misale *et al*, *Nature*, 2012;486:532-6; Hazar-Rethinam *et al*, *Cancer Discov.* 2018;8:417-27)、さらに、例えば原発巣と転移巣とでは腫瘍微小環境が異なるために、組織毎に異なった「選択圧」が加わり、組織毎に異なった *heterogeneity* が生み出される可能性も報告されてきている (Russo *et al*, *Cancer Discov.* 2016;6:147-53; Gerlinger *et al*, *N Engl J Med*, 2012;366:883-92)。ただ、これまでのところ、組織毎に異なるその「選択圧」の分子メカニズムについては明らかになっておらず、また、確率的要素で組織毎に異なった *heterogeneity* が生み出されているだけの可能性も排除しきれていない。

また、近年、癌組織から漏出した *circulating tumor DNA (ctDNA)* を血液検査で検出し、腫瘍のゲノム情報を包括的に、比較的 low cost に、かつ繰り返し解析可能な *Liquid biopsy* という方法が臨床応用されるようになった (Haber and Velculescu, *Cancer Discov.* 2014;4:650-61)。我々はこれまでに、非小細胞肺癌患者での *Liquid biopsy* の結果とその臨床情報の解析から、*Liquid biopsy* によって EGFR T790M 変異が検出されたが原発巣もしくは転移巣の一組織からの *Tissue biopsy* では同変異が検出されなかった患者においては、他の EGFR T790M 陽性非小細胞肺癌患者に比して EGFR 阻害薬 *osimertinib* の効果が乏しいことを示してきた (Ikushima *et al*, *Oncology*, 2020;98:23-8)。

この研究結果は、組織毎に異なる *heterogeneity* が存在し、それが生体全体としてみると結果として治療応答性に大きな影響を与えるものであることを意味するものである。そこで本研究では肺癌細胞に *heterogeneity* を与える腫瘍進展機構の一つとして、腫瘍免疫応答からの逃避を含む上皮間葉転換に着目し、その全容を明らかにすることを目指すこととした。

2. 研究の目的

肺癌を含む上皮系悪性腫瘍の進行過程において、一般的に上皮間葉転換が重要な役割を果たしていることが知られている (Brabletz *et al*, *Nature Reviews Cancer*, 2018;18:128-34)。これまで、上皮間葉転換は、悪性腫瘍細胞の上皮層からの離脱、組織内浸潤、血管内への遊走、腫瘍原性などとの関連が多数報告されてきているが (De Craene and Berx, *Nature Reviews Cancer*, 2013;13:97-110)、近年では、腫瘍免疫からの癌細胞の逃避においても、上皮間葉転換が重要な役割を果たしていることも知られるようになってきた (Datar and Schalper, *Clin Cancer Res.* 2016;22:3422; Terry *et al*, *Mol Oncol.* 2017;11:824)。具体的には、上皮間葉転換後の癌細胞においては、PD-L1/2 を始めとする多数の *immune inhibitory*

ligand の発現が上昇しており、また、その周囲環境には CD4+/Foxp3+ immune-suppressive regulatory T cell (Treg) が集積していることが報告されている。

しかしながら、「転換」ないし「移行」と表現されるそのプロセスについて、中間段階は十分には捉えられてはおらず、細胞レベルでの転換過程の詳細や、細胞レベルで真に転換が行われているのか否かについては、結論は出ていない。その大きな理由は、腫瘍細胞を bulk の状態で検討しているためであり、bulk 全体としては転換していることが確認できても、単一細胞レベルでの転換過程や中間段階を捉えることができていないためである。腫瘍細胞を bulk の状態で検討している段階では、細胞レベルで真に転換が行われている可能性の他に、heterogeneous な腫瘍細胞集団の配分の変化の可能性を否定しきれない。そこで、本研究課題においては、細胞レベルでの（すなわち、集団内の構成配分変化だけではない）上皮間葉転換の詳細を明らかにするために、単一細胞遺伝子発現解析の技術を用いて、上皮間葉転換の中間段階の実態を捉え、さらにそこに機械学習を組み合わせることで、時系列データの再現とモデル化を試みることにした。

さらに、得られたモデルについて、患者検体での遺伝子発現情報と予後情報を組み合わせ、遺伝子発現解析にもとづいた予後予測についても試みることにした。

3. 研究の方法

本研究課題においては、モデルの training data として腫瘍細胞「群」のデータを用いると、常に heterogeneity の要素が排除できない。また、同じく training data として単一腫瘍細胞のデータを用いると、leak の恐れがあり、構築されたモデルの正確性が評価できない可能性がある。そのため、より正確な上皮系および間葉系の phenotype の学習のために、まず、正常肺組織を用いた上皮系細胞および間葉系細胞の遺伝子発現プロファイルの構築を試みることにした。正常肺組織の単一細胞遺伝子発現データについては、European Genome-phenome Archive accession#: EGAS00001004344, Synapse accession#: syn21041850 を用いた。正常肺からの単一細胞遺伝子発現データのうち、免疫細胞、血管内皮細胞に由来する情報を除き、計 12803 細胞についての単一細胞遺伝子発現データを解析対象とした。

また、腫瘍細胞の遺伝子発現データ、及びそれに紐づく臨床情報については、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の肺腺癌、肺扁平上皮癌の情報をを用いた (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>)。

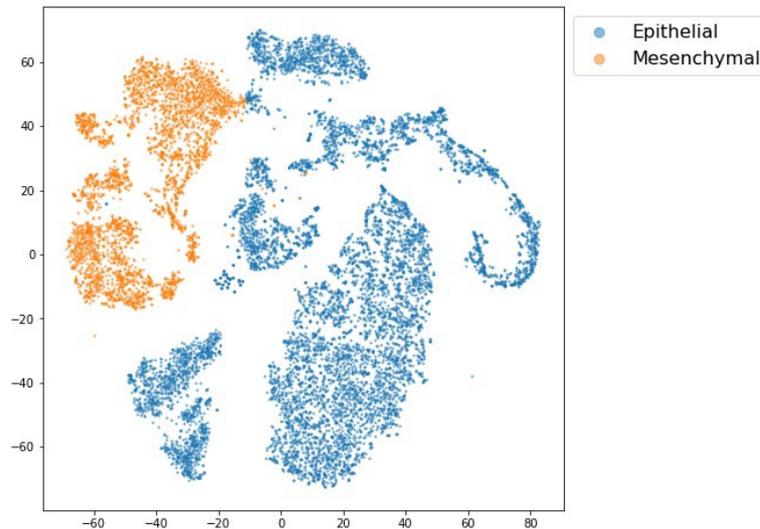
データ解析は、Python (version 3.9)、及び PyTorch, scikit-learn, lifelines のライブラリを用いて行った。

4. 研究成果

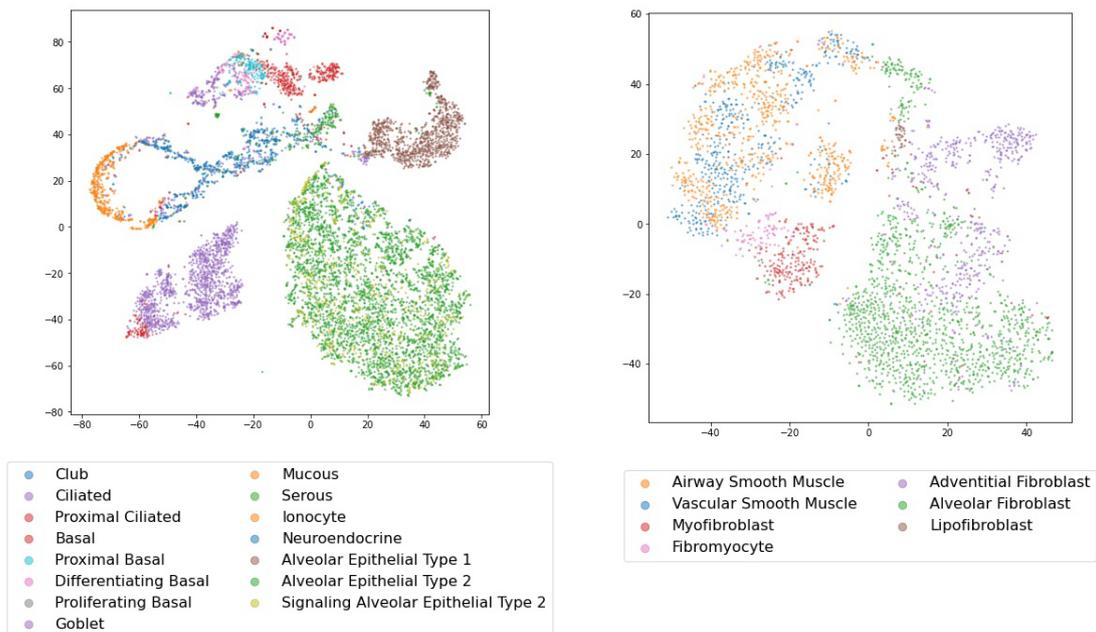
まず、正常肺からの単一細胞遺伝子発現データを本研究で用いて上皮系および間葉系の遺伝子発現プロファイルを得ることの妥当性を検証するために、正常肺からの単一細胞遺伝子発現データが細胞のアノテーションを反映しているか否かの確認を行った。上皮系細胞 (9407 細胞) と間葉系細胞 (3396 細胞) について、クラスター解析を行った。

T-distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE)による次元低下を行った結果を下図に示すが、単一細胞遺伝子発現データを用いることで、上皮系細胞と間葉系細胞が明確に

分離できることが示された。

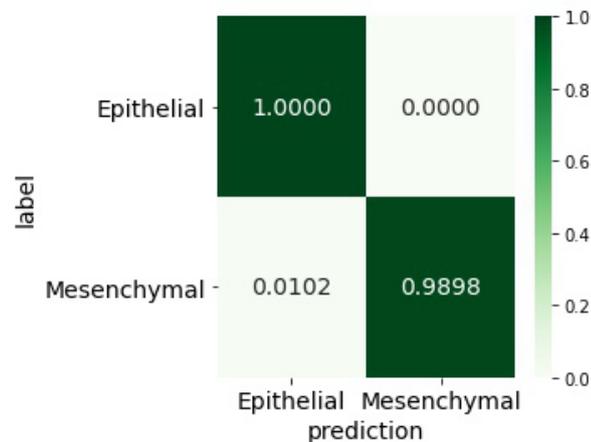


なお、さらに上皮系細胞内、および間葉系細胞内でもサブクラスターの形成がみられるかを確認したが、下図（左：上皮系細胞、右：間葉系細胞）の通り、一部の分離不十分なサブポピュレーションが存在するものの、概ね明瞭な分離ができることが確認でき、遺伝子発現情報が細胞のアノテーションを反映していることが示された。



次に、この正常肺からの単一細胞遺伝子発現データとそのアノテーションを、腫瘍の遺伝子発現情報に当てはめるために、正常肺からの単一細胞遺伝子発現データを用いた上皮系細胞と間葉系細胞への分類モデルを作成することとした。そのために、上皮系 9407 細胞と間葉系 3396 細胞のデータを用い、その遺伝子発現データを入力とし、上皮 (E) / 間葉 (M) の分類を出力として、機械学習モデルを作成し、正常肺からの単一細胞遺伝子発現データによるモデルの学習を行った。

学習後のモデルについて、検証データを用いた解析を行ったところ、以下の confusion matrix が得られ、今回作成したモデルを用いて、遺伝子発現データから高い精度で上皮 (E) / 間葉 (M) の分類が可能であることが示された。



続いて、このモデルに対して、肺癌 1024 症例の遺伝子発現データを入力データとして解析を行い、その出力として、各症例が間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率を得た。その結果、約 85% の症例 (873 症例) では、間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 未満 (すなわち、上皮 (E) 系の発現プロファイルである確率が 50% 以上) であったのに対し、約 15% の症例 (151 症例) では間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 以上であった。

また、その分布は肺扁平上皮癌であっても肺腺癌であっても同様の傾向を示した。

続いて、間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 未満 (すなわち、上皮 (E) 系の発現プロファイルである確率が 50% 以上) であった症例と、間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 以上であった症例との間での臨床情報の差異を検討した。

まず、TNM 分類に基づく臨床病期について検討したところ、上皮 (E) 系の発現プロファイルである確率が 50% 以上であった症例と、間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 以上であった症例との間で、分布に大きな差は認められなかった。

さらに、各群の全生存期間について比較したところ、統計学的有意差は得られなかったが、上皮 (E) 系の発現プロファイルである確率が 50% 以上であった症例に比べて、間葉 (M) 系の遺伝子発現プロファイルである確率が 50% 以上であった症例では、予後が悪くなる傾向が認められた。

以上の結果から、正常肺からの単一細胞遺伝子発現データに基づく腫瘍細胞の遺伝子発現パターンの解析は、臨床情報の予測に有益な情報をもたらす可能性が示唆された。今回用いた臨床データは、打ち切り症例も多く含まれており、また、背景も多岐にわたっている。正確な評価のために、今後、より背景が揃った症例群での比較を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroaki Ikushima, Yoshihisa Hiraishi, Kanto Toriumi, Takahiro Ando, Hiroyuki Tamiya, Junichi Ishida, Yosuke Amano, Hidenori Kage, Goh Tanaka, Takahide Nagase	4. 巻 9
2. 論文標題 Multiple cerebral infarctions in ROS1 rearranged lung adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respirology Case Reports	6. 最初と最後の頁 e0831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rcr2.831	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 Masahiro Yanagiya, Hajime Horiuchi, Noriko Hiyama, Jun Matsumoto, Hiroaki Ikushima, Toshio Sakatani, Kei Hara, Teppei Morikawa	4. 巻 71
2. 論文標題 Histopathological heterogeneity in an atypical type A thymoma variant with pulmonary metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 438 ~ 440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13089	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 生島 弘彬、平石 尚久、田宮 浩之、天野 陽介、鹿毛 秀宣、田中 剛、佐藤 雅昭、松元 祐司、土田 敬明、長瀬 隆英	4. 巻 43
2. 論文標題 2回の気管支ステント挿入とphotodynamic therapyを含む集学的治療により全身状態の低下を伴わずに9th-lineまでの化学療法を継続しえた肺扁平上皮癌の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 気管支学	6. 最初と最後の頁 473 ~ 479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18907/jjsre.43.5_473	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroaki Ikushima, Kazuhiro Usui, Ken Ohata, Tamaki Noie, Nobuyuki Matsuhashi, Keita Uchino
2. 発表標題 Real-world evaluation of the safety and efficacy of mFOLFOX6 for unresectable advanced gastric cancer
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡崎 俊祐、竹島 英之、吉田 敬士、藤井 洸希、西村 拓、生島 弘彬、渡邊 かおる、酒谷 俊雄、白井 一裕
2. 発表標題 確定診断に難渋した結核性リンパ節炎・心膜炎・胸膜炎の1例
3. 学会等名 第246回日本呼吸器学会関東地方会・第180日本結核・非結核性抗酸菌症学会関東支部学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 敬士、竹島 英之、藤井 洸希、西村 拓、渡邊 かおる、生島 弘彬、小原 さやか、酒谷 俊雄、白井 一裕
2. 発表標題 肺血管拡張を伴った急性好酸球性肺炎の1例
3. 学会等名 第246回日本呼吸器学会関東地方会・第180日本結核・非結核性抗酸菌症学会関東支部学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生島弘彬、鹿毛秀宣、長瀬隆英
2. 発表標題 Machine learning-based clustering of scRNAseq data from normal lung tissue and application to lung cancer
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川紅葉、生島弘彬、宮下直也、平石尚久、田宮浩之、天野陽介、鹿毛秀宣、田中剛、佐藤雅昭、松元祐司、土田敬明、長瀬隆英
2. 発表標題 PDTを含む集学的治療を行い、化学療法9th-lineに至るまでの治療継続を行っている肺扁平上皮癌の一例
3. 学会等名 第174回日本呼吸器内視鏡学会関東支部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------