

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430139

研究課題名(和文) 遺伝子発現エントロピー解析による腫瘍不均一性の検証

研究課題名(英文) Investigation of tumor heterogeneity based on analyses of transcriptomic entropy

研究代表者

涌井 昌俊 (WAKUI, MASATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90240465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シャノンのエントロピーや相互情報量に代表される情報理論を応用して、個々の生物学的経路ごとのトランスクリプトームに反映される腫瘍不均一性を定量化することに成功した。事実、複数のヒトがん細胞株の間や異なる酸素環境条件の培養の間で、腫瘍不均一性に富む代謝経路および乏しい代謝経路が検出された。これらの結果は代謝生物学的見地からの腫瘍不均一性への洞察を与え、診断・治療への応用の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We successfully applied information theory represented by Shannon's entropy and mutual information to quantification of the tumor heterogeneity reflected in the transcriptome in each of biological pathways. In fact, metabolic pathways exhibiting high or low heterogeneity were detected among a number of human cancer cell lines as well as between different oxygen environments of cell culture. These results provide insights into tumor heterogeneity from the perspective of metabolic biology, suggesting the potential of diagnostic and therapeutic application.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がんの個性診断 腫瘍不均一性 遺伝子発現 エントロピー 情報理論 代謝経路

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 腫瘍不均一性

本来生存に不利であるはずの代謝ストレスに対し、がん細胞は代謝適応を通じて自らの生存に有利な不均一性を獲得し、これが治療抵抗性や浸潤能・転移能につながる。進行がんの治療向上の鍵ともいえる腫瘍不均一性の解明にむけて、申請者らは基盤研究(C)「顕微質量分析法による代謝物分布情報に基づく腫瘍不均一性の検証」(平成22年度～平成24年度)において、がん細胞の特異な代謝特性をもたらす腫瘍不均一性の存在を明らかにした(Kubo et al, Anal. Bioanal. Chem. 400: 1895-1904, 2011)。そのような網羅的解析技術を駆使した腫瘍不均一性に関する解析をがん個性診断に応用するにあたり、データ全体を1つの系とみなして腫瘍不均一性を反映する情報理論的特性を同定するアプローチが有用であると考えられる。

### (2) エントロピーの概念

エントロピーは熱力学、統計力学、情報理論において無秩序性を表す状態量である。事象の発生が均一に近づくほどエントロピーは増大し、完全に均一なら統計力学や情報理論では最大となる。逆に事象の発生が不均一になるとエントロピーは小さくなり、1つの事象が確実に起こるならばゼロで最小となる。網羅的に得られる情報から算出されるエントロピーと最大エントロピーとの差、すなわちエントロピーが最大となるまでの“伸びしろ”は不均一性の表れである(Sato et al, Entropy 14: 233-251, 2012)。様々な生命事象が解析対象として挙げられるが、網羅的解析の代表的な対象であるトランスクリプトームは生命事象の典型である遺伝子発現の全体像であり、そのエントロピーの大小は腫瘍の均一・不均一を反映できる可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

網羅的解析で得られるデータの活用法として、腫瘍不均一性を的確に反映するバイオマーカーを探索するアプローチと、データ全体を1つの系とみなして腫瘍不均一性を反映する情報科学的特性を同定するアプローチが挙げられる。本研究では後者のアプローチをとり、情報エントロピー理論を適用して遺伝子発現情報のエントロピーを算出し、その解析を通じて腫瘍不均一性を検証し、画期的ながんの個性診断開発につながる新規の基礎知見の獲得と提示をめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 生物学的意義を有する設定条件下でのがん細胞株培養由来の網羅的トランスクリプトーム解析

ヒトがん細胞株の選択および低酸素培養実験系の確立

臨床応用を念頭に、複数の代表的な癌腫に

由来する細胞株につき、培養条件の確認を行い、可能な限り細胞株間での条件の差異を最小限とし、適切と思われるものを選択した。低酸素培養条件は申請者らの先行研究での知見を参考に設定し、予備的培養実験で選択したがん細胞株に適用できることを確認した(Matsuyama et al, Oncol. Lett. 1: 431-436, 2010)。

### 培養由来のトランスクリプトームの網羅的解析

上記で確立した実験系における培養細胞からRNAを抽出し、DNAチップにより網羅的にトランスクリプトーム解析を実施した。

### (2) トランスクリプトームのエントロピー解析に基づく腫瘍不均一性の定量的評価

#### エントロピーの算出と解析の系の構築

Shannonのエントロピーの定義に準じて、トランスクリプトームのエントロピーを算出するために基本となる式を以下のように定義した。

N個の遺伝子を対象とした網羅的発現解析において、個々の発現頻度を $X_i$  ( $i=1, 2, 3, \dots, N$ )とし、その合計をTとすると、 $X_i/T$ は事象の確率とみなされ、以下のようにトランスクリプトームのエントロピー $H$ が定義される。 $X_i$ が全てT/Nであればエントロピーは最大の $H_{\max}$ となり、その値は $\log N$ となる。

$$H = - \sum (X_i/T) \cdot \log (X_i/T) = \log T - (1/T) \cdot \sum (X_i \cdot \log X_i)$$

ヒトがん細胞株あるいは同一細胞株の培養条件の違いと遺伝子発現状況の間における情報理論的見地からの関連性に基づいた腫瘍不均一性を情報理論的に定量するために、Shannonのエントロピーの応用である相互情報量(mutual information)を計算した。これが大きければ、ヒトがん細胞株あるいは同一細胞株の培養条件の違いによって遺伝子発現状況が大きく影響されることが示される。

### 実際のトランスクリプトームデータを用いた解析

上記で設定した式に基づき、得られたヒトがん細胞株由来のトランスクリプトームデータを対象にShannonのエントロピーと相互情報量を算出する。生物学的意義との関連づけを考慮して、KEGGに則って代謝経路またはシグナリング経路ごとに着目し、各経路における細胞株個々のShannonのエントロピーおよび、細胞株間または培養条件間の相互情報量を求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子発現の情報理論的エントロピーに基づく腫瘍不均一性の定量化

各生物学的経路を構成する分子の遺伝子発現頻度分布から算出されるShannonのエントロピーによる不均一性の評価は限定的に

は有効であった。しかし、同等のエントロピーであっても遺伝子発現頻度分布の様相が大きく異なる場合があり、Shannon のエントロピーのみでは、目的である腫瘍不均一性を十分に検出するのは困難であることが判明した。これを克服するために、比較する複数のグループの違いと遺伝子発現頻度分布の違いの間で算出される相互情報量を採用した。その結果、相互情報量の大きさで不均一性の大きさを定量的に表現できることが明らかになった。これにより、個々の生物学的経路に着目して網羅的解析データを総体的に情報理論的定量を行うことで、腫瘍不均一性に富んだ生物学的経路を同定できる可能性が示された（投稿準備中）。腫瘍不均一性に立脚した診断治療の層別化の標的となる生物学的経路を網羅的に探求できるアプローチとして有望である。

#### (2) 異なるヒトがん細胞株間における不均一性の定量的評価

約 70 個の代謝経路を対象に、ヒト大腸がん、肺がん、乳がん等のそれぞれに由来する複数の細胞株の間で、Shannon のエントロピーと相互情報量から不均一性を評価したところ、いずれの癌腫についても、エネルギー生成を担う根源的な代謝経路（解糖、クエン酸回路、電子伝達・酸化的リン酸化経路）は腫瘍不均一性に乏しいことが示唆された。一方、脂質代謝、アミノ酸代謝、ビタミン代謝、糖鎖代謝に属する一部の代謝経路に顕著な不均一性が認められた。これらの代謝経路は、腫瘍不均一性に基いた診断治療の層別化の標的となることが期待される（投稿準備中）。

#### (3) 酸素環境の違いに関連したヒトがん細胞株の不均一性定量的評価

ヒト肺がんと大腸がんのそれぞれに由来する複数細胞株を対象に正酸素または低酸素の条件下で培養して検討した。低酸素抵抗性で生存性が保持される細胞株は総じていずれの代謝経路についても、Shannon のエントロピー変化や相互情報量は小さく、酸素環境の違いによる不均一性は概ね乏しかった。一方、低酸素感受性で生存性が低下する細胞株は種々の代謝経路において相互情報量が大きく、特にクエン酸経路および電子伝達・酸化的リン酸化経路は特徴的であった（投稿準備中）。これらは低酸素に対する感受性・抵抗性の予測、あるいは低酸素に着目した治療法の開発に有用な可能性がある。

大腸がん由来については、免疫不全マウスを宿主とする肝転移モデルで転移巣形成可能な細胞株は、酸素環境の違いによる不均一性が解糖に特徴的に認められた。これは、転移に関連する腫瘍不均一性の代謝特性を示唆する知見である（Nishime et al, J Immunol 195: 1883-1890, 2015. および投稿準備中）。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nishime C, Kawai K, Yamamoto T, Katano I, Monnai M, Goda N, Mizushima T, Suemizu H, Nakamura M, Murata M, Suematsu M, Wakui M. Innate Response to Human Cancer Cells with or without IL-2 Receptor Common  $\gamma$ -Chain Function in the NOD Background Mice Lacking Adaptive Immunity. *J. Immunol.* 195 (4):1883-1890, 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1402103 (査読有り).  
Hoshino Y, Hayashida T, Hirata A, Takahashi H, Chiba N, Ohmura M, Wakui M, Jinno H, Hasegawa H, Maheswaran S, Suematsu M, Kitagawa Y. Bevacizumab terminates homeobox B9-induced tumor proliferation by silencing microenvironmental communication. *Mol. Cancer.* 13 (1): 102, 2014, doi:10.1186/1476-4598-13-102 (査読有り).

Yamauchi Y, Izumi Y, Asakura K, Kawai K, Wakui M, Ohmura M, Suematsu M, Nomori H. Lewis Lung Carcinoma Progression Is Facilitated by TIG-3 Fibroblast Cells. *Anticancer Res.* 33 (9): 3791-3798, 2013, <http://ar.iiarjournals.org/content/33/9/3791.long> (査読有り).

### 〔学会発表〕(計 1 件)

Nishime C, Wakui M, Kawai K, Yamamoto T, Katano I, Monnai M, Goda N, Mizushima T, Suemizu H, Nakamura M, Murata M, Suematsu M. Innate Effector Mechanisms for Elimination of Human Cancer Cells in the NOD-Background Mice Lacking Adaptive Immunity. 5th International Workshop on Humanized Mice (IWHM5), January 28-30th, 2016, Zurich (Switzerland).

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

### 〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

涌井 昌俊 (WAKUI MASATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90240465

### (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし