

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710020

研究課題名(和文) アクセス可能な治療標的探索の為のがん-間質細胞間相互作用のシーケンシング解析

研究課題名(英文) Sequence-based Cancer-stromal Interactome Analysis for Accessible Therapeutic Targets

研究代表者

石川 俊平 (SHUMPEI, ISHIKAWA)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50418638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌細胞のマウス移植系におけるトランスクリプトームシーケンスのデータから、マウスとヒトとの配列を分離して癌細胞と間質細胞との細胞間相互作用全体(インターラクトーム)を解析する方法を高精度化した。この方法を用いて、様々な癌種の細胞や臨床検体から樹立したXenograftの解析を行い、癌の組織像を反映したインターラクトームプロファイルや、特定の癌種で重要な相互作用候補を同定することができ、候補分子のいくつかについては実際の臨床組織で腫瘍や間質特異的な局在等を確認できた。

研究成果の概要(英文)：We established the method of analyzing the entire cancer cell-stromal cell interaction (interactome) from the transcriptome sequence data of cancer xenograft tissues, by accurate separation of human and mouse sequence. Using this method, we analyze the xenograft established from various type of cancer cells and clinical cancer tissues. We successfully confirmed that the interactome profile well reflects the actual histology of the cancer, and identified the candidate important interactions in a particular cancer subtype. For some of candidate molecules we could confirm their tumor-specific and stroma-specific localization in actual clinical cancer tissues.

研究分野：病理学 ゲノム科学

キーワード：ゲノム がん 治療標的

1. 研究開始当初の背景

並列型シーケンサーの導入よりがんの配列の変異・コピー数変化・転座などの体細胞変異のプロファイルが可能となり多くのがん種で全ゲノム、全エクソームの解析がなされてきている。その結果一部のがんを除く多くのがん種では多種類の低頻度の変異が個々のがん症例で散発的に起こる全体像が明らかになってきており、その発がんメカニズムに対する知見とは別に、多くの症例に共通する Druggable Target(創薬可能なターゲット)が予想よりも少ないことが明らかになってきた。Loss of function のタンパクや pathway 単位の変異をターゲットとする難しさもあり Druggable Target Protein はゲノム解析技術の進歩に比べると大きく変化はしていない。がんの間質浸潤や血管新生などは、がん細胞と周囲の線維芽細胞・血管内皮・炎症細胞などの間質細胞との間の細胞間相互作用であり幅広く多くのがん種で共通して見られる現象である。がん-間質の細胞間相互作用に関わる重要な分子として VEGF - VEGFR, TGFB - TGFBR, Collagen - Integrin など多数の報告がある。しかしながら通常のゲノムの発現解析、体細胞変異解析と異なり、がん-間質の細胞間相互作用は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が難しく、特定のがん種・特定の症例で最も寄与の高い相互作用を選び出すアプローチが困難であった。この包括的定量解析の難しさが、細胞間相互作用に関わる Druggable Target を選び出す大きなハードルのひとつとなっていたと考えられる。

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いる。すなわち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、複数のタンパク質相互作用のデータベースデータ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。この手法により多くの既知の相互作用についてその活性と相互依存性が半定量的に解析され、重要な相互作用を選び出すことが可能となる。本研究では新規の細胞間インターラクトーム解析技術を用いて、本邦において保健衛生上重要な難治癌を対象とした解析を行う。これらのがん腫について樹立された Xenograft の解析を行い間質依存性に寄与する Druggable Target タンパクの同定を目的とする。また臨床腫瘍組織からマウス内に直接移植された Direct Xenograft は通常の細胞株と異なりフラスコなどの環境下では腫瘍細胞単独で生育できない。このような臨床腫

瘍組織からの Direct Xenograft 組織のインターラクトームプロファイルを体系的に解析し、in vitro で培養可能な細胞株からの Xenograft との比較により、がん細胞の生存に必須ながん間質相互作用及びその相互作用を担う Druggable な細胞外・細胞表面タンパクを同定する。これらの研究のなかで分子標的治療薬の標的・バイオマーカーの候補を同定し、より詳細に解析を加える。

3. 研究の方法

本研究は3年の計画である。現行の開発したアルゴリズムのより高精度化を図りつつ、胃がん膵がんなどの難治性がんの細胞株や臨床検体からの Xenograft 組織をの解析を幅広く行い、間質依存性に寄与する Druggable Target タンパクの同定の解析を行う。またこれらの解析で特徴が見られたがん腫について症例を増やして解析を進めると共に、併せて解析で上がってきた重要な候補についてはモノクローナル抗体を用いてターゲットバリデーションを行う。臨床がん検体からの Direct Xenograft 組織については他機関とパイロット共同研究を行っておりここからの提供を受ける予定である。

申請者らの開発した細胞間相互作用はマウスとヒトの配列の分離精度は 99.9%程度であるが、特定の遺伝子については分離が難しいものも存在している。より長いリードに対応した実験手法とアルゴリズムとの改良を行いこれらの遺伝子についても分離精度を向上させる。また現状のデータベースにおいては、異なる複数のデータベースで再現された信頼性の相互作用のみが用いられているが、よりターゲットディスカバリーに適した報告例の少ないものも含め2倍以上の相互作用に拡張する。また臨床がん検体からの Direct Xenograft 組織については主要な癌種を中心に提供をうけて解析し、申請者らがこれまで作成してきた培養細胞株由来の Xenograft のデータとの比較解析を行い間質依存性に寄与する相互作用の同定を行う。これらの毛解析で解析されてきた重要ながん間質相互作用及びその相互作用を担うタンパク候補については Xenograft 症例を増やして検討するとともに、当該腫瘍の臨床組織検体を免疫染色・In situ hybridization によってタンパクの局在やその集団内頻度についての検討を行う。

4. 研究成果

マウスに移植したヒトがん Xenograft 系における全トランスクリプトームシーケンスからマウス由来 RNA とヒト由来 RNA との配列を分離するアルゴリズムのより高精度化を行なった。プロトタイプにおける細胞間相互作用はマウスとヒトの配列の分離精度は 99.9%程度であるが、特定の遺伝子については分離が難しいものも存在している。より長いリードに対応した実験手法とアルゴリズ

ムとの改良を行いこれらの遺伝子についても分離精度を向上させることに成功した。プロトタイプデータベースにおいては、異なる複数のデータベースで再現された信頼性の高い少数の相互作用が用いられているが、よりターゲットディスカバリーに適した相互作用数まで拡張することを試み、データベースのアップデートを行った。PPI データベースからこれまでインタラクトームのデータベースにはいっていなかったものについて文献を検索して追加を行った。また獲得免疫系に関わる分子など、ヒトとマウスのオルソログ関係がはっきりしないものについては別途まとめることによって高精度化を行った。また各検体のインタラクトームの相対的な強度の比較、グループの平均的なプロファイルの可視化が可能のように、インタフェースの構築を行った。癌の原発巣と転移巣など比較したい検体間のインタラクトームの違いの全体が容易に可視化により把握可能なインタフェースの構築を行った。全体像をよりわかりやすく表示させるための色調の改良を行った他、興味のある検体群、遺伝子を指定して表示させる機能を付け加えた。

これらのデータベースを用いて、複数のがん種の細胞株のゼノグラフトからインタラクトームのシーケンシングのプロファイリングを行った。間質の多い腫瘍においては、強い相互作用の数が多く観察され、また血管の多い腫瘍では血管新生のプロファイルが顕著に認められるなど、当該組織を反映したインタラクトームのプロファイルが得られていることが分かった。いくつかの分子標的となりうる既知の相互作用についても移植した細胞種によって大きく別れることがわかった。Direct Xenograft 組織の解析においては膵がん・胃がん・大腸がん・肺がんなどについてデータの解析を行い間質依存性に寄与する相互作用の解析を行なった。

同一患者由来の検体においても、原発巣と転移巣由来のゼノグラフトにおいてはがんと間質の相互作用の様式が大きく異なることが判明した。Xenograft 組織のインタラクトーム全体の解析に加えて各相互作用をそれが担う機能によってグループ化したモジュールによってインタラクトームのプロファイルを解析し、特定の機能を持つグループが極めて相互依存性が高いなどの特徴を有することが分かった。その他癌細胞同士の間質細胞同士の autoregulation を主成分とするモジュールも見つかった。

個別の相互作用においては膵癌において間質の増殖に重要とされるものがインタラクトーム全体のなかで相対的な寄与が高いことが示されたほか、これまで癌間質相互作用の担体としてあまりよく知られていなかったタンパクや、知られてはいたもののその相対的寄与度が不明であったタンパクが明らかになり、新しい治療標的と考えられた。

そのうちいくつかについては免疫組織化学等で検証を加え、癌特異的発現、間質特異的発現を確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Hayashi A, Morikawa T, Kawai T, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M. Clinicopathological and prognostic significance of EZH2 expression in upper urinary tract carcinoma. *Virchows Arch.* 2014 Apr;464(4):463-71. doi: 10.1007/s00428-014-1541-6. Epub 2014 Jan 21. PubMed PMID: 2444603

Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, Ishikawa S, Homma Y, Fukayama M.

Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Jun;21(6):2105-12. doi: 10.1245/s10434-014-3503-2. Epub 2014 Feb 4. PubMed PMID: 24492923

石川俊平 がんと間質のインタラクトーム解析、病理と臨床 ゲノム創薬と病理、査読無、32(8)、2014、p850-856

[学会発表](計7件)

シーケンシングによるがん間質間相互作用の網羅的解析
砂河 孝行、河村 大輔、佐藤 玲子、貴志 一樹、鈴木 良平、石川 俊平
日本人類遺伝学会 第 60 回大会 仙台
2015/10/14

Comprehensive analysis of tumor - stromal interactome
D. Komura, T. Isagawa, R. Sato, K. Kishi, R. Suzuki, S. Ishikawa
CSH-ASIA/AACR JOINT MEETING: BIG DATA, COMPUTATION, AND SYSTEMS BIOLOGY IN CANCER, Suzhou, China 2015/12/02

Visualizing whole cancer-stromal interactome
Kazuki Kishi, Daisuke Komura, Takayuki Isagawa and Ishikawa Shumpei
13th European Conference on Computational Biology, Strasbourg, France, Sep.7-Sep.10, 2014

がん治療標的探索のための細胞間相互作用のゲノミクス
石川俊平、河村大輔、佐藤玲子、砂河孝

行、加藤洋人、油谷浩幸。深山正久
第 102 回日本病理学会総会 札幌 2013
年 6 月 6 日(木)～8 日(土)

Systematic profiling of
cancer-microenvironment interactome
in cancer tissue
Shumpei Ishikawa, Daisuke Komura,
Ryohei Suzuki, Reiko Sato, Masashi
Fukayama, Hiroyuki Aburatani
第 72 回日本癌学会学術総会 横浜 2013
年 10 月 3 日(木)～5 日(土)

がんと間質の相互作用の包括的解析
石川俊平、河村大輔、貴志一樹、佐藤玲
子、砂河孝行、油谷浩幸
日本人類遺伝学会 第 58 回大会 仙台
2013 年 11 月 20 日(水)～23 日(土)

Sequencing-based approach for cancer
-stromal interactome
Shumpei Ishikawa
2013 SNUCRI Cancer Symposium, Phoenix
Island in Jeju Island, May
2th-4th,2013

〔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〕
ホームページ等
<http://www.tmd.ac.jp/gpat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 俊平 (ISHIKAWA Shumpei)
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 教授
研究者番号：50418638

(2) 連携研究者

中村 雅登 (NAKAMURA Masato)
東海大学 医学科基盤診療学系 教授

研究者番号：00164335