

平成30年6月25日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06916

研究課題名(和文) 一細胞ゲノムおよびトランスクリプトーム解析によるがん細胞進化と不均質性生成の解明

研究課題名(英文) Revealing cancer-cell evolution and intra-tumor heterogeneity by single-cell genome and transcriptome analysis

研究代表者

加藤 護 (Kato, Mamoru)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・部門長

研究者番号：40391916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内不均質性のダイナミクスを解明すべく、大腸がんマウスモデル再構成系において、腫瘍培養細胞の皮下導入直前、導入1ヶ月後、3ヶ月後で細胞を採取し、C1を用いて一細胞エクソームとトランスクリプトームをシーケンスした。結果、皮下導入前後でDNAの多様性は減少する一方、RNAの多様性は増大していた。さらに、RNAでの多様性の増加は、新しいがん細胞分集団の発生と対応していた。その分集団には、細胞増殖や上皮-間葉転換、さらに幹細胞に関する遺伝子発現が異なるという特徴があり、そのダイナミクスが解明できた。しかもこれらの結果が、転移定着や他の臨床項目と関連していることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：To reveal heterogeneity dynamics of cancer, we sampled single cells in a colorectal cancer mouse model right before, and 1 and 3 months after transplantation, and then used C1 to sequence both single-cell exome and transcriptome. We revealed that the heterogeneity of DNA decreased after transplantation, whereas that of RNA increased. This heterogeneity increase corresponded to the newly generated subpopulations of cancer cells. They had distinct features in markers such as cell proliferation, epithelial-mesenchymal transformation, and stem cell, and we revealed the dynamics of the feature change. We also found associations with metastatic colonization and a certain clinical factor.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：がんゲノム 一細胞シーケンス 腫瘍内多様性

1. 研究開始当初の背景

がん組織は均質ではない。細胞間で異なる病理像を呈し、異なるマーカーを発現することもある。このような腫瘍内不均質性は、診断や治療にも影響を与える。たとえば、腫瘍の不均質性(多様性)の度合いが高いと、腫瘍が悪性化しやすいという報告がある(Maley et al, 2006, Nat Genet)。また不均質性は、がん細胞の薬剤耐性獲得のしやすさとも関係があると示唆されている(Wang et al, 2014, Nature)。

申請者が総説で述べたように(加藤、医学のあゆみ、2014)、腫瘍内不均質性はがん細胞一つ一つの個性に由来すると考えられるため、細胞一つ一つの遺伝子の状態を検出する一細胞シーケンスは、腫瘍内不均質性を解明する強力な技術である。一細胞シーケンスには、主に、一細胞トランスクリプトーム技術と一細胞ゲノム技術がある。一細胞ゲノム技術は、2011年、当時申請者が所属していたコールド・スプリング・ハーバー研究所において、flow cytometry と次世代シーケンシングが組み合わせられて開発された(Navin et al, 2011, Nature)。この研究では、乳がん組織 100 細胞の細胞一つ一つに対し、シーケンス・データから染色体の区画ごとに染色体コピー数が情報科学的に推定され、コピー数パタンの類似性をもとに系統樹が作成された。そこで発見されたことは、
1. 100 細胞は 4 つの異質な集団に分かれ、いわゆる中間種のような集団は検出されなかった。
2. しかし集団内では細胞は互いによく似ていた。
3. 以上からがん細胞の進化は徐々に進むものではなく、ある時急激に進化し平衡に至る、いわゆる断続平衡進化に近いと推定された。

がんは 1970 年代からダーウィン進化との関連を示唆されていたが(Nowell, 1976, Science)。この技術によって初めて、直接的観測を通じたがん細胞進化の解明が可能となった。その後、幾つかのグループががんへの適用に関する研究を発表している(Hou et al, 2012, Cell; Hu et al, 2012, Cell; Li et al, 2012, GigaScience; Zong et al, 2012, Science; Wang et al, 2014, Nature)。

しかしながら、従来の研究ではコストや技術の成熟度の問題から、ゲノムのみ、あるいは、トランスクリプトームのみ、が解析されてきた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、腫瘍内不均質性のダイナミクスを解明すべく、大腸がんマウスモデル再構成系において、一細胞ゲ

ノムとトランスクリプトームを両方、複数時刻点にわたって測定する。それによって、時刻によって変わるオミックス変化(主体となる変化は、ゲノム変化か、転写プログラムの変化か、その全てか)や、がん細胞がどのように進化して発現を変えていくのかを明らかにする。

3. 研究の方法

申請者の所属する国立がん研究センターの筆宝義隆博士らは、最近ヒト大腸発がんの in vitro モデル系を確立した(Onuma et al, 2013, PNAS)。これはマウス正常腸管細胞の 3 次元培養細胞に、いくつかのがん抑制遺伝子の働きを止める小分子 RNA を単独または組み合わせで導入し、短期間でヌードマウスに皮下腫瘍を形成する系である。

このモデル実験系において、APC をノックダウンし、腫瘍培養細胞の皮下導入直前を対照サンプルとして、導入 1 ヶ月後(腫瘍細胞間での生存競争の開始時期)、導入 3 ヶ月後(腫瘍発達時)の 3 時刻点で、細胞群を採取した。

取得されたサンプルを、当センター新井康仁博士の協力の下、微少流路を利用した細胞分離器 C1 を用いて、1 細胞に分離した。C1 によって、分離した細胞から DNA/RNA が自動的に増幅される。

増幅された一細胞の DNA/RNA に対し、当センター柴田龍弘博士の協力の下、Illumina HiSeq によって、各測定点で約 40 細胞の RNA、約 20 細胞の DNA をシーケンスした。DNA に関しては、経済的な効率性から、ゲノムではなくエキソームをシーケンスした。さらに、正常組織、および皮下導入直前より前の時刻における組織の、バルク DNA/RNA シークエンスデータを得た。

得られたデータから、RNA に関しては、Bowtie2 や RSEM を用いて TPM 単位の発現量を算出した。また、DNA に関しては、まずバルク DNA を cisCall によってコールし、それと同じ位置の SNV を、パイル・アップデータを分析することでコールした。

4. 研究成果

DNA 解析では各時点 20-30 細胞、RNA 解析では各時点 40-50 細胞のシーケンスに成功した。

それぞれのシーケンスデータに対し、品質チェックを行った。まず、DNA 解析では、一細胞シーケンス解析により得られた塩基配列情報の網羅性を検出するため、各時点の全一細胞について、各座位でのマッピング情報をもとに Lorenz curve 解析を実施した。

さらに、技術的なエラーを検出するための各細胞の Allelic drop rate (ADO rate) の算出など数理的分析を実施した。これら解析の結果をふまえて、各時点で信頼性の低いサンプルデータを排除することに成功した。

また、RNA 解析では、検出された遺伝子数を Bulk と全一細胞シーケンスの結果比較することにより、正確性の低い細胞データの排除を試みた。その結果、得られたリード数が少ないにもかかわらず、検出される遺伝子数が大きいサンプルが検出され、これらを除去した。さらに、各時点において全一細胞データから求められた発現量(TPM)の平均と Bulk の TPM をプロットし、比較した。その結果、全時点で相関係数 0.9 程度以上の高い相関を示した。一細胞データをまとめたものは、Bulk と同一の結果になると考えられるため、これらサンプルデータは発現量解析に用いても問題がないと考えられた。

得られた RNA の発現量データを元に、細胞間で変動のある遺伝子の同定を行った。その結果、分化に関わる遺伝子など、興味深い遺伝子が同定された。また、時刻間で多様性が変化する遺伝子进行分析した結果、いくつかがん関連遺伝子が関わっていた。また、大腸がんに関連する重要な遺伝子や分化マーカーの発現量の細胞間変動および時刻変動を解析し、興味深い結果を得た。RNA トランスクリプトームの PCA 解析および多様性の時刻変化も計算した。さらに、ヒートマップ解析、細胞周期や上皮 - 間葉系に関わる遺伝子の PCA 解析を行った。

DNA データに関しては、コールされた変異を用いて細胞間の MDS (Multi-dimensional scaling) 解析を行った。その結果を基に、多様性解析も行った。

バルクのデータから、バルク組織の発現量算出、変異検出、さらにコピー数変化検出を行った。これらのデータがヒト大腸がんのどの特徴に近いかを、変異数密度やコピー数変化、マーカー遺伝子の変異や発現量进行分析し、さらに機械学習を行うことによって、同定した。

解析の結果をまとめると、マウスの大腸がん再構成系において、皮下導入直前・直後で DNA の多様性は減少するにもかかわらず、RNA の多様性は増大するという、DNA/RNA 一細胞シーケンスによって初めて分かる興味深い結果を得た。さらに、RNA での多様性の増加は、2つの新しいがん細胞分集団が発生したことと対応していた。これら2つの分集団には、細胞増殖や上皮 - 間葉系、さらに幹細胞に関する遺伝子発現が異なるという特徴があり、それが時刻とともに変わっていくダイナミクスを解明することが出来た。しかもこれらの解析が示唆する結果が、似た発現パタ

ンを分析することによって、ヒトの大腸がんのある臨床項目と関連していることも発見された。さらに、このダイナミクスと metastatic colonization との関連も示唆され、上記の発見が臨床的にも意義のあることが分かった。

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 13 件)

1. 著者: Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K, Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, Hippo Y, Usui T, Ohama T, and Sato K. 論文標題: SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness 誌名: Mol. Cancer. Res 査読: 有 巻: 16 発行年: 2018 頁: 554-563 国際共著: - DOI: 無 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
2. 著者: Hama N, Totoki Y, Miura F, Tatsuno K, Saito-Adachi M, Nakamura H, Arai Y, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Mukai W, Hiraoka N, Aburatani H, Ito T, Shibata T. 論文標題: Epigenetic landscape influences the liver cancer genome architecture. 誌名: Nat Commun. 査読: 有 巻: 9 発行年: 2018 頁: - 国際共著: - DOI: 無 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
3. 著者: Daisuke Shiokawa, Hiroyasu Ohata, Ai Sato, Michihiro Muto, Shigeki Sekine, Masahito Hosokawa, Mamoru Kato, Hideki Kanbara, Tatsuhiro Shibata, Koji Okamoto 論文標題: The induction of selected Wnt target genes by Tcf1 mediates generation of tumorigenic colon stem cells 誌名: Cell Reports 査読: 有 巻: 19 発行年: 2017

頁：981-994
国際共著：-
DOI：無
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）

4.
著者：Tsuyoshi Takahashi, Asmaa Elzawahry, Sachiyo Mimaki, Eisaku Furukawa, Rie Nakatsuka, Hiromi Nakamura, Takahiko Nishigaki, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Seiichi Hirota, Tatsuhiro Shibata, Katsuya Tsuchihara, Toshiro Nishida, and Mamoru Kato
論文標題：Genomic and transcriptomic analysis of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors
誌名：Genes, Chromosomes & Cancer
査読：有
巻：56
発行年：2017
頁：303-313
国際共著：-
DOI：無
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）

5.
著者：Maru Y, Tanaka N, Ohira M, Itami M, Hippo Y, Nagase H
論文標題：Identification of novel mutations in Japanese ovarian clear cell carcinoma patients using optimized targeted NGS for clinical diagnosis
誌名：Gynecol Oncol
査読：有
巻：144
発行年：2017
頁：377-383
国際共著：-
DOI：無
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

6.
著者：Sugita S, Arai Y, Aoyama T, Asanuma H, Mukai W, Hama N, Emori M, Shibata T, Hasegawa T.
論文標題：NUTM2A-CIC fusion small round cell sarcoma: A genetically distinct variant of CIC-rearranged sarcoma Human Pathology
誌名：Human Pathology
査読：有
巻：印刷中
発行年：2017
頁：印刷中
国際共著：-
DOI：無
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

7.
著者：Shigeki Sekine, Taisuke Mori, Reiko Ogawa, Masahiro Tanaka, Hiroshi Yoshida, Hirokazu Taniguchi, Takeshi Nakajima, Kokichi Sugano, Teruhiko Yoshida, Mamoru Kato, Eisaku Furukawa, Atsushi Ochiai, and Nobuyoshi Hiraoka
論文標題：Mismatch repair deficiency commonly precedes adenoma formation in Lynch syndrome-associated colorectal tumorigenesis
誌名：Modern Pathology
査読：有
巻：印刷中
発行年：2017
頁：印刷中
国際共著：-
DOI：無
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

8.
著者：Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y and Tanuma N.
論文標題：Ex vivo model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells.
誌名：Oncology Lett.
査読：有
巻：14
発行年：2017
頁：6863-6868
国際共著：-
DOI：無
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

9.
著者：Mamoru Kato, Daniel A. Vasco, Ryuichi Sugino, Daichi Narushima, and Alexander Krasnitz
論文標題：Sweepstake evolution revealed by population-genetic analysis of copy-number alterations in single genomes of breast cancer
誌名：Royal Society Open Science
査読：有
巻：4
発行年：2017
頁：-
国際共著：-
DOI：無
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

10.
著者：Shinichi Yachida, ..., Mamoru Kato, ..., Tatsuhiro Shibata
論文標題：Genomic sequencing identifies ELF3 as a driver of ampullary carcinoma
誌名：Cancer Cell
査読：有
巻：29
発行年：2016
頁：229-240
国際共著：該当
DOI：無
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）

11.
著者：Maru Y, Orihashi K, Hippo Y
論文標題：Lentivirus-based stable gene delivery into intestinal organoids
誌名：Methods Mol Biol
査読：有
巻：1422
発行年：2016
頁：13-21
国際共著：-
DOI：無
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

12.
著者：Ryutaro Uchi, ..., Mamoru Kato, ..., Koshi Mimori
論文標題：Integrated multiregional analysis proposing a new model of colorectal cancer evolution
誌名：PLOS Genetics
査読：有
巻：12
発行年：2016
頁：1-24
国際共著：-
DOI：無
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）

13.
著者：加藤 護
論文標題：一細胞シーケンスのデータ解析
誌名：医学のあゆみ
査読：無
巻：258
発行年：2016
頁：317-323
国際共著：-
DOI：無
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

〔学会発表〕(計 11 件)

1.
発表者：Mamoru Kato
発表標題：Single-cell sequencing combined with mathematical approaches reveals the generative processes of intra-tumor heterogeneity
学会名：NGS Field Meeting (招待講演)
発表時期：2017 年
発表場所：

2.
発表者：筆宝 義隆
発表標題：3 次元オルガノイド培養のがん研究への応用
学会名：第 26 回日本癌病態治療研究会
発表時期：2017 年
発表場所：

3.
発表者：筆宝 義隆
発表標題：オルガノイドを用いた発がん過程の in vitro 再構成
学会名：第 58 回日本臨床細胞学会総会春季大会 (招待講演)
発表時期：2017 年
発表場所：

4.
発表者：筆宝 義隆
発表標題：オルガノイド移植モデルおよび PDX による胆道・膵管発がん再構成
学会名：第 76 回日本癌学会学術総会
発表時期：2017 年
発表場所：

5.
発表者：松浦哲也、落合雅子、中島淳、今井俊夫、筆宝義隆
発表標題：in vitro モデルが明らかにするマウス膵管発がんにおける Kras 遺伝子材の重要性
学会名：第 75 回日本癌学会学術総会
発表時期：2016 年 10 月 06 日 ~ 2016 年 10 月 08 日
発表場所：パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6.
発表者：新井康仁、中村浩実、十時 泰、濱 奈津子、尾島英知、細田文恵、島田和明、森実千種、奥坂拓志、柴田龍弘
発表標題：Oncogenic driver fusion genes in biliary tract cancer
学会名：第 75 回日本癌学会学術総会
発表時期：2016 年 10 月 06 日 ~ 2016 年 10 月 08 日
発表場所：パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

7.

発表者：筆宝義隆、丸喜明、落合雅子、松浦哲也、今井俊夫
発表標題：オルガノイドを用いた胆嚢発がんモデルの確立
学会名：第75回日本癌学会学術総会
発表時期：2016年10月06日～2016年10月08日
発表場所：パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

8.
発表者：丸喜明、松浦哲也、落合雅子、筆宝義隆
発表標題：レンチウイルスを用いたマウス胃細胞からの発がん誘導
学会名：第20回日本がん分子標的治療学会学術集会
発表時期：2016年05月30日～2016年06月01日
発表場所：別府国際コンベンションセンター（大分県・別府市）

9.
発表者：加藤 護
発表標題：Single-cell sequencing reveals genomic and transcriptomic dynamics during tumor development in a mouse model
学会名：第75回日本癌学会学術総会
発表時期：2016年10月06日～2016年10月08日
発表場所：パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

10.
発表者：Mamoru Kato
発表標題：Tumor heterogeneity and single-cell sequencing
学会名：74rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
発表時期：2015年10月08日～2015年10月10日
発表場所：Nagoya, Japan

11.
発表者：Mamoru Kato
発表標題：Bioinformatics for clinical sequencing and single-cell sequencing
学会名：Mathematics in Cancer Genome Analysis, Mathematical Cooperation Program 2015
発表時期：2015年09月30日～2015年09月30日
発表場所：Tokyo, Japan

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
一細胞シークエンスによる、腫瘍内不均質性とがん細胞進化の解明
<http://www.nccri.ncc.go.jp/s031/010/020/20151208182431.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者
加藤 護 (KATO, Mamoru)
国立がん研究センター・バイオインフォマティクス部門・部門長
研究者番号：40391916

(2)研究分担者
筆宝 義隆 (HIPPO, Yoshitaka)
千葉県がんセンター・発がん制御研究部・部長
研究者番号：30359632

新井 康仁 (ARAI, Yasuhito)
国立がん研究センター・がんゲノミクス分野・主任研究員
研究者番号：80222727

(3)連携研究者
柴田 龍弘 (SHIBATA, Tatsuhiro)
国立がん研究センター・がんゲノミクス分野・分野長
研究者番号：90311414

(4)研究協力者 ()