

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07963

研究課題名(和文) 系統的エピゲノム情報に基づく肝癌組織の細胞別デコンボリューション

研究課題名(英文) Cellular deconvolution analysis of hepatocellular carcinoma based on the systemic epigenomic profiles

研究代表者

永江 玄太 (Nagae, Genta)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：10587348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌臨床組織を構成する癌細胞および非癌細胞の構成組成を、系統的エピゲノム情報を用いてバルク癌組織のデータのみから高精度に定量する手法を確立し、その有用性を検証した。混合線形モデルでデコンボリューションを行い、各種細胞の構成比率と癌細胞の純粋なメチル化率を推定した。肝臨床組織のマルチオミクス解析に実装したところ、癌組織が含む腫瘍細胞由来の割合をLUMP法で推定した結果と上皮系細胞画分とは非常によく相関することが明らかになった。バルクのメチル化データの階層的クラスタリングで同定した腫瘍細胞成分が少ないサブグループ(E4)は、CD4・CD8+ T細胞や単球・マクロファージ系細胞が多い傾向がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌組織の一部には間質の増生や炎症細胞浸潤の高いものも存在するが、こうした症例はしばしば大規模プロジェクトの対象外とされてきたため、ドライバー変異を含む分子プロファイルとの関係が明らかでない。本研究課題で開発した推定法により、こうした症例も含めたあらゆる肝癌組織の分子プロファイルを対象にしようと考えられた。また、非癌細胞の構成比率を明らかにすることで、癌細胞の純粋なメチル化プロファイルを逆算することも可能となり、新たなエピゲノム制御異常が解明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established and validated a method to accurately quantify the composition of cancerous and non-cancerous cells comprising the clinical liver cancer tissues. Cell deconvolution was performed in a mixed linear model to estimate the compositional ratio of various cells and the pure methylation rate of individual cells. When implemented in a multi-omics analysis of liver clinical tissues, it was found that the percentage of tumor cell fraction estimated by LUMP method were well correlated with the result of epithelial cell fraction in this approach. The subgroups (E4) with fewer tumor cell components identified by hierarchical clustering of bulk methylation data tended to be dominated by CD4+ and CD8+ T cells, monocytes and macrophage-like cells.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：肝がん DNAメチル化 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

この10数年のゲノムシーケンス技術の飛躍的な進歩を背景に北米のTCGA計画や国際がんゲノムコンソーシアム(ICGC)などによる主要癌腫の分子プロファイルが進み、肝臓においても主要なドライバー遺伝子変異とこれに関連する遺伝子発現やDNAメチル化によるサブグループが報告されてきた。TERTプロモーターやTP53、CTNNB1などのドライバー変異とこれに関連するシグナル経路の制御異常およびエピゲノム変異が明らかとなり、包括的プロファイルに基づく分子生物学的層別化が可能となった一方で、肝臓にはこうしたサブグループに対応したDruggable targetが欠如しており、マルチキナーゼ阻害剤以外に有効な治療オプションがほとんどないことが問題である。そうした中、現在(2017年当時)欧米で行われている免疫チェックポイント阻害剤の上皮系腫瘍に対する臨床試験の結果は非常に期待できるものであり、肝臓でも15%程度にpartial responseの可能性があるとされている。このことは、肝臓臨床組織においても癌細胞に対する免疫寛容状態が存在し、これを解除することで抗腫瘍効果を惹起しうることを意味しており、肝臓組織内に浸潤する炎症細胞や間質細胞など非癌細胞が形成する微小環境の解明が重要であると考えられる。

そこで、癌微小環境の病態理解や癌免疫治療の戦略を立てる上での基盤的解析手法を確立するために、肝臓臨床組織を構成する癌細胞と癌周囲の微小環境を構成する様々な非癌細胞の組成比率を肝臓組織のバルク解析結果のみから推定することができないか、と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓臨床組織を構成する癌細胞および非癌細胞の構成組成を、系統的エピゲノム情報を用いてバルク癌組織のデータのみから高精度に定量する手法を確立し、その有用性を検証することである。具体的には、以下のサブテーマを明らかにする。

- (1) 肝臓組織の構成細胞比率定量法の確立
- (2) 肝臓組織の臨床組織への応用
- (3) 構成細胞比率定量法の有効性の検証

3. 研究の方法

- (1) 肝臓組織の構成細胞比率定量法の確立

構成細胞比率の定量予測には、混合線形モデルでデコンボリューションを行い、各種細胞の構成比率と癌細胞の純粋なメチル化率を推定する。癌臨床組織のバルクで計測したメチル化率は、各種細胞のメチル化率に細胞の構成比率を積算した値の合計値となる。癌細胞そのものの純粋なメチル化プロファイルは未知であるが、ゲノム変異解析におけるアリル頻度比から推定した癌細胞の含有率が入力可能であり、これら一連の推定を細胞系譜特異的メチル化プローブの数だけ繰り返し試行を行う。

- (2) 肝臓組織の臨床組織への応用

肝芽腫組織約130例のマルチオミックス解析(ゲノム変異、遺伝子発現、DNAメチル化)を用いて構成細胞プロファイルを作成した。遺伝子発現プロファイルを用いた構成細胞予測法はCIBERSORT法を用い、最新のアルゴリズムでは22種類の免疫細胞に分画推定することが可能であるが、メチル化プロファイルとの比較を考慮し、主要な7分画(B細胞、NK細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、単球、好中球、好酸球)を検討対象とした。メチル化プロファイルについても同様に、FACSで単離した各細胞画分(B細胞、NK細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、単球、好中球)のメチル化プロファイルを用いて混合線形モデルでデコンボリューションを行った。

- (3) 構成細胞比率定量法の臨床応用可能性の検証

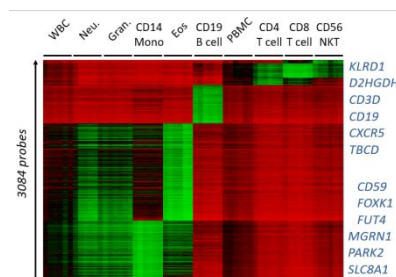
DNAメチル化プロファイルおよび遺伝子発現プロファイルの両方を解析した症例について、それぞれの画分の比較検証を行った。腫瘍成分、非腫瘍成分の割合に加えて、免疫細胞のそれぞれの画分における検出能を比較した。

4. 研究成果

- (1) 肝臓組織の構成細胞比率定量法の確立

癌組織における腫瘍細胞のみの含有率を推定する方法は、ゲノム変異解析の変異アリル頻度を用いる手法がいくつか確立されている。DNAメチル化情報を利用した腫瘍含有率推定も提案はされているが、精度が十分でないため、本研究課題では推定に有用な独自のプローブ選択を行い、精度の向上を図った。非癌細胞の構成比率予測については遺伝子発現プロファイルをもとに予測する手法がいくつか考案されているものの、精度もまた不十分であるのに加えて炎症細胞のみの予測にとどまっている。

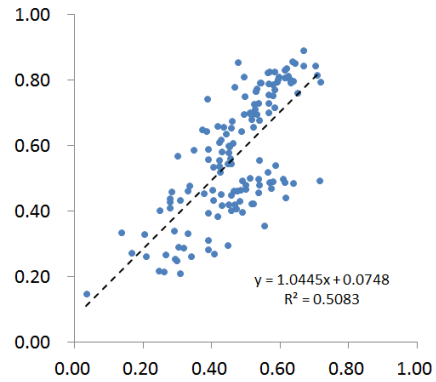
エピゲノム情報は、細胞系譜に沿った時空間的な遺伝子発現制御を行う上での基盤的情報であり、系統的に細胞種特異的なマーカープローブのプロファイルを作成することが可能であった(右図)。DNAメチル化修飾は化学的に安定であることから臨床組織サンプルの保存状態の影響



が最小限となり、構成細胞比率の高精度な定量を得る上で理想的な情報になると考えられた。

(2) 肝癌組織の臨床組織への応用

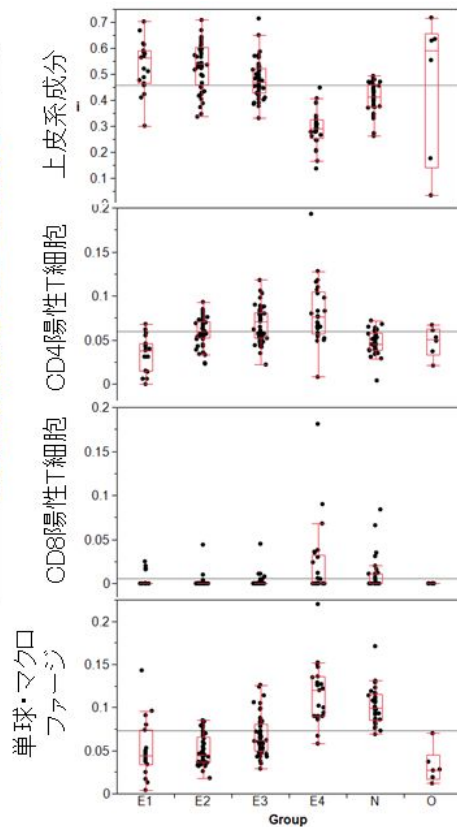
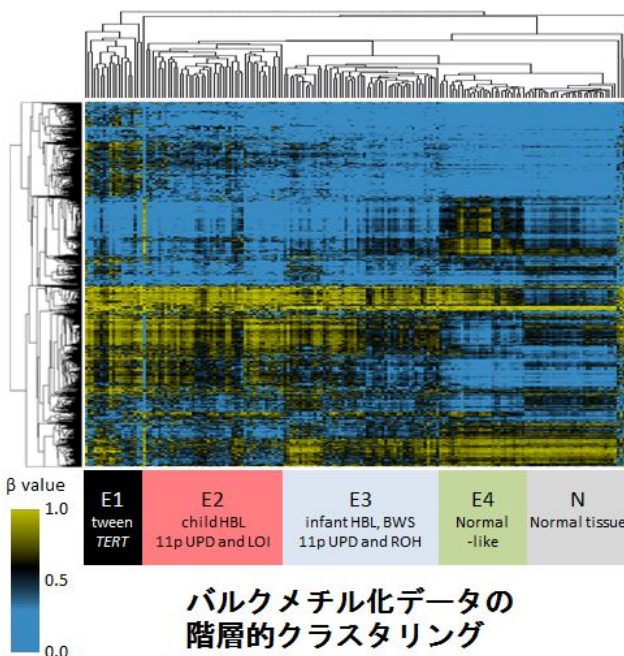
肝芽腫組織約 180 例のマルチオミックス解析 (ゲノム変異、遺伝子発現、DNA メチル化) を用いて構成細胞プロファイルを作成した。最初に、メチル化プロファイルを用いた腫瘍画分推定を行い、癌組織が含む腫瘍細胞由来の割合を LUMP 法で推定した。次に、このプロファイルについて、上皮系細胞画分、繊維芽細胞画分および各種免疫細胞画分 (B 細胞、NK 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、単球、好中球) に混合線形モデルでデコンポリューションを行った。右図に示すように、142 例の検討で腫瘍画分推定結果と上皮系細胞画分とは非常によく相関することが明らかになった。



肝癌組織の一部には間質の増生や炎症細胞浸潤の高いものも存在するが、こうした症例はしばしば大規模プロジェクトの対象外とされてきたため、ドライバー変異を含む分子プロファイルとの関係が明らかでない。本研究課題で開発した推定法により、こうした症例も含めたあらゆる肝癌組織の分子プロファイルを対象にしようと考えられた。また、非癌細胞の構成比率を明らかにすることで、癌細胞の純粋なメチル化プロファイルを逆算することも可能となり、新たなエピゲノム制御異常が解明できる可能性がある。

(3) 構成細胞比率定量法の臨床応用可能性の検証

DNA メチル化プロファイルおよび遺伝子発現プロファイルの両方を解析した症例 (124 例) について、それぞれの画分の比較検証を行った。腫瘍成分、非腫瘍成分の割合に加えて、免疫細胞のそれぞれの画分における検出能を比較した。バルクのメチル化プロファイルで行った階層的クラスタリングで 4 つのサブグループを同定したが、E4 のサブグループは腫瘍細胞成分が少なく、非癌組織と同様のメチル化パターンを示している (下図参照)。これらの細胞は、今回行った細胞別デコンポリューションでも上皮系細胞成分が少ないだけでなく、CD4 および CD8 陽性 T 細胞や単球・マクロファージ系細胞が多い傾向がみられた。遺伝子発現プロファイルで CIBERSORT 法で解析した結果も同様の傾向を認めたが、好中球と単球・マクロファージ系細胞が不十分である可能性が示唆された。逆に、メチル化プロファイルでは CD8 陽性 T 細胞の画分がかなり低値を示すことから、これらをよく分離できるようなメチル化プローブの選出が、感度を高めるために重要であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishiyama Atsuya, Mulholland Christopher B., Bultmann Sebastian, Kori Satomi, Endo Akinori, Saeki Yasushi, Qin Weihua, Trummer Carina, Chiba Yoshie, Yokoyama Haruka, Kumamoto Soichiro, Kawakami Toru, Hojo Hironobu, Nagae Genta, Aburatani Hiroyuki, Tanaka Keiji, Arita Kyohei, Leonhardt Heinrich, Nakanishi Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15006-4	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 該当する
1. 著者名 The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium	4. 巻 578
2. 論文標題 Pan-cancer analysis of whole genomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 82 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-1969-6	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 該当する
1. 著者名 Yamamoto Shogo, Midorikawa Yutaka, Nagae Genta, Tatsuno Kenji, Ueda Hiroki, Moriyama Mitsuhiro, Takayama Tadatosh, Aburatani Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Spatial and temporal expansion of intrahepatic metastasis by molecularly defined clonality in multiple liver cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 601 ~ 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14282	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 Nakato Ryuichiro, Wada Youichiro, Nakaki Ryo, Nagae Genta, Katou Yuki, Tsutsumi Shuichi, Nakajima Natsu, Fukuhara Hiroshi, Iguchi Atsushi, Kohro Takahide, Kanki Yasuharu, Saito Yutaka, Kobayashi Mika, Izumi-Taguchi Akashi, Osato Naoki, Tatsuno Kenji, Kamio Asuka, ..., Aburatani Hiroyuki, Kimura Hiroshi, Shirahige Katsuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive epigenome characterization reveals diverse transcriptional regulation across human vascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 77 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-019-0319-0	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 該当する

1. 著者名 Tatsuno Kenji, Midorikawa Yutaka, Takayama Tadatashi, Yamamoto Shogo, Nagae Genta, Moriyama Mitsuhiro, Nakagawa Hayato, Koike Kazuhiko, Moriya Kyoji, Aburatani Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Impact of AAV2 and Hepatitis B Virus Integration Into Genome on Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Prior Hepatitis B Virus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6217 ~ 6227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-4041	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 Nomura Masashi, Saito Kuniaki, Aihara Koki, Nagae Genta, Yamamoto Shogo, Tatsuno Kenji, Ueda Hiroki, Fukuda Shiro, Umeda Takayoshi, Tanaka Shota, ..., Narita Yoshitaka, Nagane Motoo, Nishikawa Ryo, Ueki Keisuke, Saito Nobuhito, Aburatani Hiroyuki, Mukasa Akitake	4. 巻 9
2. 論文標題 DNA demethylation is associated with malignant progression of lower-grade gliomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1903 ~ 1903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38510-0	査読の有無 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	国際共著 -

1. 著者名 Namba Shinichi, Sato Kazuhito, Kojima Shinya, Ueno Toshihide, Yamamoto Yoko, Tanaka Yosuke, Inoue Satoshi, Nagae Genta, Inuma Hisae, Hazama Shoichi, Ishihara Soichiro, Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Kawazu Masahito	4. 巻 110
2. 論文標題 Differential regulation of CpG island methylation within divergent and unidirectional promoters in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13937	査読の有無 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	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Chiemi, Yamamichi Nobutake, Tomida Shuta, Takahashi Yu, Kageyama-Yahara Natsuko, Sakurai Kouhei, Takeuchi Chihiro, Inada Ken-ichi, Shiogama Kazuya, Nagae Genta, Ono Satoshi, Tsuji Yosuke, Niimi Keiko, Fujishiro Mitsuhiro, Aburatani Hiroyuki, Tsutsumi Yutaka, Koike Kazuhiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Transduced caudal-type homeobox (CDX) 2/CDX1 can induce growth inhibition on CDX-deficient gastric cancer by rapid intestinal differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3853 ~ 3864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13821	査読の有無 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	国際共著 -

1. 著者名 Sato Kazuhito, Kawazu Masahito, Yamamoto Yoko, Ueno Toshihide, Kojima Shinya, Nagae Genta, Abe Hiroyuki, Soda Manabu, Oga Takafumi, Kohsaka Shinji, Sai Eirin, Yamashita Yoshihiro, Inuma Hisae, Fukayama Masashi, Aburatani Hiroyuki, Watanabe Toshiaki, Mano Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Fusion Kinases Identified by Genomic Analyses of Sporadic Microsatellite Instability?High Colorectal Cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 378 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-18-1574	査読の有無 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	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Norihiro, Okuno Yusuke, Yoshida Kenichi, Shiraishi Yuichi, Nagae Genta, Suzuki Kyogo, Narita Atsushi, Sakaguchi Hiroto, Kawashima Nozomu, ..., Aburatani Hiroyuki, Mano Hiroyuki, Miyano Satoru, Ogawa Seishi, Takahashi Yoshiyuki, Muramatsu Hideki	4. 巻 131
2. 論文標題 Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1576 ~ 1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-07-798157	査読の有無 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	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nagae G, Yamamoto S, Fujita M, Tatsuno K, Nakagawa H, Hiyama E, Aburatani H
2. 発表標題 Molecular landscape of Hepatoblastoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genta Nagae
2. 発表標題 Specific roles and regulation of TET1 in epithelial carcinoma
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genta Nagae, Satoshi Ohta, Takayoshi Umeda, Yutaka Midorikawa, Hiroyuki Aburatani
2. 発表標題 Feasibility and clinical usefulness of detecting aberrant methylation in cell-free DNA
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	緑川 泰 (Midorikawa Yutaka) (10292905)	国立精神・神経医療研究センター・総合外科部・部長 (82611)	

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