

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20397

研究課題名（和文）がん代謝パスウェイにおける発現変化に基づいたドライバー変異遺伝子の同定解析

研究課題名（英文）Identification analysis of driver mutated genes based on expression regulation in the cancer metabolism pathway

研究代表者

凌 一葦 (Ling, Yiwei)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70804540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞内の代謝パスウェイの発現変化は遺伝子変異に依る発がんの結果と言え、がん細胞のクリニカルシーケンスの結果に基づいて、がん細胞内で実際に起きている代謝パスウェイの異常がどの変異が原因で起きているかを明確化し、がん代謝パスウェイネットワークの構築に基づいたドライバー変異遺伝子同定の研究を実施した。変異の特徴の層別化、代謝ネットワークの破綻経路の明確化、ドライバー変異モジュールの同定、及び発がんメカニズムと治療ターゲットの考察を順次解析してきた。また、胃がん症例が重複する2つの異なるサブタイプの類似点と相違点について、がん変異とパスウェイとの関連性を探索する研究との関連で明確化し研究論文を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特定の変異を持つこととそれが原因で生じる代謝パスウェイの異常を繋げることで、がんの発生メカニズムやがん細胞内の相互制御メカニズムを明らかにすることを目指す。実際にクリニカルシーケンスを臨床現場で利用することを想定した場合、このような各種変異によって何が起きているかを明確化しておくことは、治療方針を決定する段階において非常に意義がある。将来的には、より精確な治療と薬剤感受性の予測を通じ、患者に対する無用な投薬や副作用を減らす効果が期待できる。また、不適切な投薬による医療費の無駄遣いを削減することも期待されることから、個別化医療を実現するための必須の非常に独創的な研究と言える。

研究成果の概要（英文）：In cancer cells, expression regulations of metabolic pathways can be considered as the result of carcinogenesis due to gene mutations. To classify whether the above viewpoint, I conducted a study of driver gene identification based on the construction of a cancer metabolism pathway network. I have sequentially stratified of mutation characteristics, clarified metabolic pathways disrupted by mutations, identified driver mutation modules, and then discussed candidate related carcinogenic mechanisms and therapeutic targets.

We also published a research paper in which we clarified the similarities and differences between two different subtypes of overlapping gastric cancer cases, in relation to studies exploring the association between cancer mutations and pathways and published a research paper.

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 がん変異 代謝パスウェイ

1. 研究開始当初の背景

「ゲノムの病気」とも言えるがんは、腫瘍細胞に蓄積した遺伝子変異が、細胞内の正常な営みを担当する遺伝子ネットワークやシグナル伝達・代謝などのパスウェイに入り込み、無秩序な細胞増殖と機能異常を起こす細胞集団である (Alioto TS, et al., Nature Communications, 2015)。異なるドライバー遺伝子が寄与する複数の代謝パスウェイが関係することで、がん細胞は、異常増殖の不均一性や、異なる抗がん剤に対する感受性、予後の良し悪しなど様々な個性を持つことになる (Suzuki H et al., Nature Genetics, 2015)。このため、がんの遺伝子変異と代謝パスウェイの破綻との関係は非常に注目されている (Vogelstein B et al., Science, 2013)。また、クリニカルシーケンス技術を応用する個別化医療の分野でも、DNA 配列解読によるゲノム変異の網羅的な同定技術が飛躍的に進歩していることに伴い、多数のがんサンプルデータから取り出した大規模な変異情報と遺伝子ネットワークとの関連から、がんの発症メカニズムに関する特徴をマイニングする方法論の開発がますます重要性を増している (Kandath C et al., Nature, 2013; Fujimoto A et al., Nature Genetics, 2016)。

2. 研究の目的

本研究では、特定の変異を持つこととそれが原因で生じる代謝パスウェイの異常を繋げることで、がんの発症メカニズムやがん細胞内の相互制御メカニズムを明らかにすることを目指す。これにより、がんの生命プログラム及びその多様性の理解や、個別化医療の論理的根拠を進化させる。

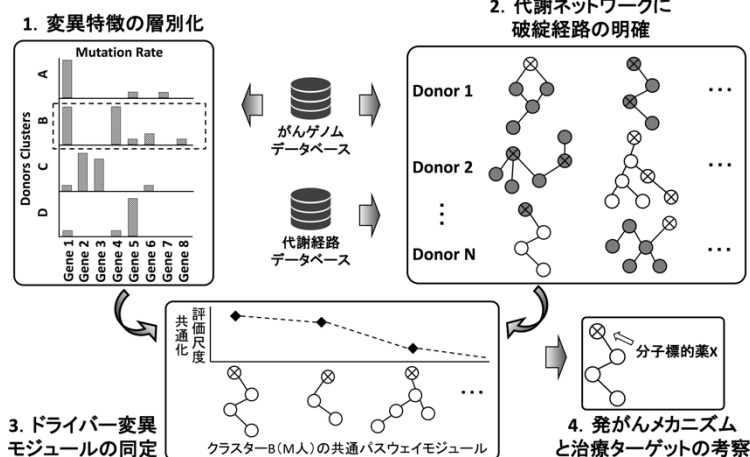
3. 研究の方法

ドライバー遺伝子とそれに関わる代謝モジュールがどのように患者の臨床情報と繋がっているかを確認するため、申請者らが開発してきた分子標的薬に対応する患者集団内の変異パターンの検出手法を実際のがんゲノムデータに応用してきた (Nagahashi M, Ling Y et al., JCO Precision Oncology, 2018; Sato S et al., Scientific Reports, 2018; Shimada Y et al., Oncotarget, 2017; Ichikawa H et al., Genome Medicine, 2017;

Nagahashi M et al., Genome Medicine, 2016; 亀山能史 et al., 癌と化学療法, 2016)。しかし、層別化された患者集団や異なるメカニズムのがん細胞内で、実際に起きている代謝パスウェイの異常がどの変異が原因で起きているかは不明なままである。本研究ではこれを明確化した (研究計画の模式図に示す)。

がん変異の代謝パスウェイへの影響の程度を明らかにするために、最も基本となるのは各遺伝子が関与する代謝パスウェイのサブネットワークの構築である (研究計画の模式図-2. 代謝ネットワークに破綻経路の明確)。ネットワークとしてタンパク質相互作用情報のデータベース STRING に加え、文献から分子間相互作用やシグナル伝達の情報を抽出した。本研究で注目する

研究計画の模式図



のは、ある特定の遺伝子に異常が生じることで下流のサブパスウェイの遺伝子発現が全体として発現促進・抑制されているようなモジュールとなる。ここでは、ある遺伝子から別の遺伝子までの代謝系の流れを辿ることで得られるサブパスウェイを網羅的に抽出した。そのため、グラフデータベースを駆使し、ある特定の2遺伝子間のシンプルパス（同じところを2度通らない経路の数を数えるアルゴリズムを用い）をすべて抽出した。これをすべての遺伝子間で計算することでサブネットワークを網羅した。このように、がん細胞に特徴的なパスウェイ、シグナル伝達経路を統合化し、本研究で解析対象とするがん代謝パスウェイ情報を得た。

ゲノム変異の情報と遺伝子の発現情報は本研究では不可欠な2要素であり、両方の解析を実施したプロジェクトとしてTCGA (The Cancer Genome Atlas) のデータベースを利用した。特定の遺伝子変異を持つ集団を層別化するため申請者らが開発したクラスタリングによる層別化手法 (Nagahashi M et al., *Genome Medicine*, 2016) を適用し、がん腫毎に変異パターンの異なるがん患者集団 (クラスター) を得る (研究計画の模式図-1. 変異特徴の層別化に参照)。遺伝子発現情報を代謝パスウェイサブネットワークに関わる遺伝子にマッピングした (研究計画の模式図-2. 代謝ネットワークに破綻経路の明確)。代謝パスウェイサブネットワーク全体で発現促進・抑制が観察されるような代謝モジュールを網羅できる。その中から、異なるがんメカニズムを代表する集団の発現変化が顕著で発がんに関連する代謝モジュールを統計手法で検出し、「ドライバー代謝変異モジュール」とする (研究計画の模式図-3. ドライバー代謝変異モジュールの同定に参照)。即ち、当ドライバー代謝変異モジュールの遺伝子発現に対する制御の強さに基づいて、ドライバー遺伝子を識別できる。それにより、各ドライバー遺伝子の異常がどの経路にどういった影響を及ぼしているかを評価することで、ゲノム変異から層別化したがん患者集団における投薬や治療のターゲットを明確にするための指標づくりを実施した。最終的には個々の患者から得られたがん細胞のクリニカルシーケンスに基づいて、最適な治療の選択実現するための基盤を整備することが可能になった (研究計画の模式図-4. 発がんメカニズムと治療ターゲットの考察に参照)。

4. 研究成果

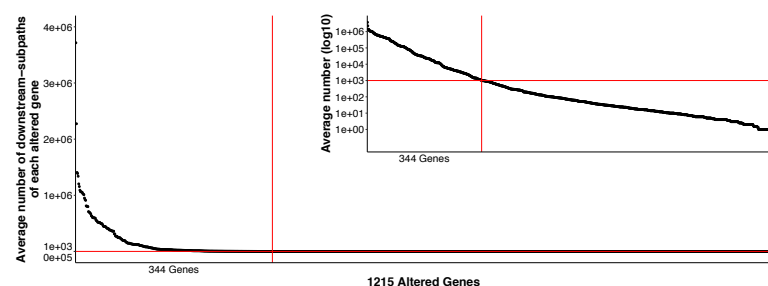
(1) パスウェイ抽出手法の開発

本研究のデータ解析部分として、遺伝子情報と代謝ネットワークをあわせたがん変異に関わる代謝パスウェイの抽出は重要な因子である。申請者は、TCGA データベースのがん変異および発現データを応用し、STRING (Protein-Protein Interaction Networks, <https://string-db.org>) の代謝パスウェイと結びつけ、ある特定の2遺伝子間のシンプルパスをすべて抽出する解析手法を開発した。

TCGA 大腸がんプロジェクト (Cancer Genome Atlas Network, *Nature*, 2012) データの解析を例として、具体的な操作は以下の抽出条件に沿った：

- ① 変異遺伝子が関与する一連のパスウェイ内にある10の遺伝子への影響をみるため、がん変異遺伝子から下流のパスウェイの長さを3以上10以下に指定した。
- ② 変異遺伝子下流パスウェイのRNA-seq発現については、パスウェイ遺伝子の発現を絶対値2以上に制限した。
- ③ ネットワーク内の無駄なループ計算を回避するため、複数の子ノードからマックス4つをランダムで選んで、パスウェイ構造にいった。

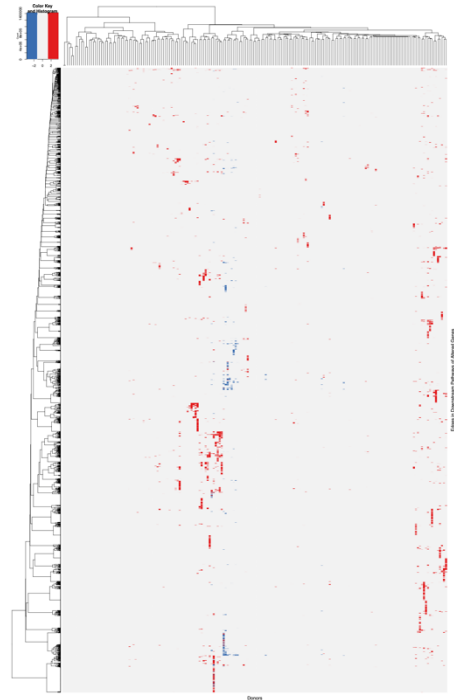
これにより、シーケンシングされた192例大腸がん患者の1215個変異遺伝子に関わる約8.5億本の変異パスウェイが見つかった。右図はTCGA大腸がんサンプルの変異遺伝子に関わる変異パスウェイ数の分布図である。



(2) 患者クラスターにおけるドライバー変異モジュールの同定手法の開発

以上のパスウェイ抽出手法を用いて、すべての遺伝子間（エッジ）で遺伝子発現に基づいた計算から網羅的なサブネットワークのクラスタリングを実施した。つまり、変異パスウェイ上の発現変動のあるエッジを持つパターンで患者集団の層別化ができた（右図は TCGA 大腸がんの例である）。

そこで、それぞれの患者集団における各変異パスウェイ情報についてベイズ線形回帰モデルを構築し、変異遺伝子の発現と下流パスウェイの関係を調べた。このアプローチでは、それぞれのパスウェイにおける各遺伝子の発現変化の大きさ及びその発現遺伝子のパスウェイ上での場所についての本回帰モデルへの影響を考慮した。この手法で、各患者集団での変異遺伝子と下流の変異パスウェイとの対応関係をスコア化し、該当患者集団に主に重要な数個の変異遺伝子及びドライバー変異モジュールの同定手法を開発した。



(3) 胃がんサブタイプについての変異とパスウェイ解析

胃がんにおいて組織病理学的分類とゲノム変異に基づく分類から得られる多くの症例が重複する 2 つの異なるサブタイプの類似点と相違点について、がん変異とパスウェイとの関連性を探索する研究論文を発表した（Ling Y et, *Computational Structural Biotechnology Journal*, 2020）。

胃がんは、世界中で最も一般的な臨床疾患の 1 つである。伝統的な組織病理学的なローレン分類でびまん性タイプは特に予後が悪い。最近の胃がん患者のがんゲノミクス研究で遺伝子変異のパターンから新たにゲノム安定性（GS）サブタイプという分類が提案されている。この GS タイプは、組織病理学的にびまん性タイプと多くの症例が共有されている事が知られている。これらの 2 つの異なるサブタイプに有意に異なる遺伝的特徴を同定するため、本研究では、TCGA 大規模がんゲノムデータを活用することで、胃がん研究（Cancer Genome Atlas Research network, *Nature*, 2014）にびまん性タイプと GS サブタイプの腫瘍サンプルの遺伝子変異頻度を比較した。背景にある変異頻度の確率分布より有意に変異が蓄積している遺伝子を複数発見し、それらの分子特性について議論した。また、これらの 2 つのサブタイプに特徴的な変異パターンとしての **Mutational signature** を特定した。その結果、びまん性タイプと GS サブタイプには、遺伝子変異が生じる原因が異なっている可能性を発見した。病理組織学的な分類以外に、ゲノム変異に基づくがんゲノムとしての分類について、特に予後の悪いびまん性胃がんとその共通項が多いゲノム安定性タイプの詳細を情報科学を駆使して解析した。本研究は、がんの発症メカニズムについて議論できる土台ができ、がん患者の変異パターンに基づいて最適な治療を選択できる可能性を示唆した。今後、がんのゲノム変異の視点から個別化医療基盤の整備に向けて本研究成果を活用することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Cui De-jun, Yang Xiao-lan, Okuda Shujiro, Ling Yi-wei, Zhang Zhu-xue, Liu Qi, Yuan Wen-qiang, Yan Fang	4. 巻 48
2. 論文標題 Gallincin ameliorates colitis-associated inflammation and barrier function in mice based on network pharmacology prediction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0300060520951023	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 Ling Yiwei, Watanabe Yu, Nagahashi Masayuki, Shimada Yoshifumi, Ichikawa Hiroshi, Wakai Toshifumi, Okuda Shujiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Genetic profiling for diffuse type and genomically stable subtypes in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Computational and Structural Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 3301~3308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.csbj.2020.10.021	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 Arabiki Michiru, Shimada Yoshifumi, Nakano Mae, Tanaka Kana, Oyanagi Hidehito, Nakano Masato, Ling Yiwei, Okuda Shujiro, Takii Yasumasa, Wakai Toshifumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Verification of the Japanese staging system for rectal cancer, focusing on differences with the TNM classification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1443~1451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02024-4	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 -
1. 著者名 Matsumoto Akio, Shimada Yoshifumi, Nakano Mae, Oyanagi Hidehito, Tajima Yosuke, Nakano Masato, Kameyama Hitoshi, Hirose Yuki, Ichikawa Hiroshi, Nagahashi Masayuki, Nogami Hitoshi, Maruyama Satoshi, Takii Yasumasa, Ling Yiwei, Okuda Shujiro, Wakai Toshifumi	4. 巻 43
2. 論文標題 RNF43 mutation is associated with aggressive tumor biology along with BRAF V600E mutation in right-sided colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1853~1862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7561	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Watanabe Y., Ling Y., Uemura H., Yoshizawa A.C., Ishihama Y., Okuda S.
2. 発表標題 Network analysis of proteogenomics data in lung cancer cell lines.
3. 学会等名 HUP02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ling Y., Yoshizaki H., Okuda S.
2. 発表標題 Genome-wide analysis of mutational impact on post translational modification.
3. 学会等名 ISMB2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeuchi S., Ling Y., Watanabe Y., Shimada Y., Wakai T., Okuda S.
2. 発表標題 Mutational signatures and clinicopathological relationship extracted from clinical sequence data of 201 cases with colorectal cancer.
3. 学会等名 ASHG2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------