

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09068

研究課題名（和文）がん微小環境情報を考慮したがんゲノム解析モデルの開発

研究課題名（英文）Prediction of cancer microenvironment using deconvolution analysis

研究代表者

笠島 理加（Kasajima, Rika）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所がん分子病態学部・副技官・主任研究員

研究者番号：20630875

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）：がん細胞のゲノム情報とがん細胞を取り巻く微小環境のゲノム情報を合わせることでがんゲノム医療の精度を大きく向上させたい。本研究において、臨床現場で取得可能なバルクの膵癌組織やオルガノイドを用いたRNA-seqデータをオルガノイドや手術検体の膵がん組織検体のシングルセル解析により得られたSignature matrixから数的に各細胞グループに分離、分析する新規Virtual dissectionモデルを構築した。また、がん-間質相互作用をネットワーク解析より抽出し、がん細胞と微小環境の両方を対象にした次世代がんゲノム医療の実現を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノム情報を利用したがんと間質細胞間の相互作用解析（インタラクトーム解析）に関する報告が次々となされ始め、がんと微小環境の両方を標的とする治療法の探索が試みられている。がん細胞と微小環境、両方のゲノム情報を加味したがんゲノム医療を臨床現場で実現可能かどうかを検討することによって、がんゲノム医療が高精度化されると共に、大規模臨床試験段階でFailureした既存の候補薬剤の有効なPopulationを同定することが可能となり、より精緻な治療法をより多くのがん患者に届けることができるようになると思われる。

研究成果の概要（英文）：We would like to greatly improve the accuracy of cancer genome medicine by combining the genomic information of cancer cells with that of the microenvironment surrounding cancer cells. In this study, we tried to construct a novel virtual deconvolution model to mathematically separate and analyze RNA-seq data using bulk pancreatic cancer tissues and organoids into each cell group based on the signature matrix obtained by single cell analysis of pancreatic cancer tissue samples from organoids and surgical specimens. We also extracted cancer-stromal interactions from the network analysis to try to realize next-generation cancer genome medicine targeting both cancer cells and microenvironment.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Virtual dissectionモデル がん微小環境 膵癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療が臨床で実践される段階を迎え、ゲノム情報と臨床情報とを合わせたビッグデータを解析することにより、遺伝子変異の意味や治療の効果がリアルワールドエビデンスとして提示されるようになった。しかし、現在のがん臨床シーケンスは、遺伝子変異に対して効果のあると推察される分子標的薬を提案しており(Sunami et al., *Cancer Science*, 2018)、今後 Target sequence から Whole genome sequence (WGS) + RNA-seq へと解析方法をアップグレードしようとしている。更に、治療到達率の飛躍的な向上を目指すには、「がん細胞のみを対象とする」という枠組みだけではなく、癌の進展(増殖、生存、浸潤、転移)を促進している微小環境の情報も加味することが重要であると考えられる。

乳癌では、ホルモンレセプターや HER2 発現によってサブタイプ分類し、サブタイプ別に治療法を選択するという手法が以前から実臨床で採用されており、検査の進歩と共にサブタイプ分類もより細分化されてきている。消化器癌においても、近年、がん組織における遺伝子の発現パターンを用いたサブタイプ分類(Comprehensive molecular subtype: CMS)が提唱され、CMS 別での治療法の選択が試みられている(Guinney J et al., *Nat Med.* 2015, *Cancer Letters*, 2018)。膵癌でも CMS の報告はなされているが、膵癌組織の特異性(著名な間質増生やがん組織内の癌細胞含有率の低さなど)のため、bulk のがん組織を用いた遺伝子発現解析では、癌細胞の特徴を同定することは難しいと考えられる。実際、Collisson ら(Collisson EA et al., *Nat Med.*, 2011)や Bailey ら(Bailey P et al., *Nature*, 2016)の CMS では、exocrine-like subtype が存在し、これは癌部に隣接した正常組織の Phenotype を反映していると指摘されている(Raphael BJ et al., *Cancer Cell*, 2017)。このような bulk 組織を用いたゲノム解析の limitation を克服するため、Moffitt らは bulk 組織の遺伝子発現データを数理モデルを用いて(実際に組織や細胞を分離することなく)細胞グループごとに分離分析し、がん細胞と間質とをそれぞれサブタイプ分類した(Moffitt RA et al., *Nat Genet.*, 2015)。彼らはこの解析手法を“Virtual dissection”と呼称し、一定の評価は得られたが、新規治療戦略や実際の治療効果の向上には結びついておらず、今後前向き試験や single cell 解析などによる検証が待たれている。

このように、膵癌組織では微小環境(Tumor microenvironment; TME)が癌細胞によって積極的に構築され、様々な側面から癌の進展(増殖、生存、浸潤、転移)を促進している(Bardeesy N et al., *Nature Rev. Cancer*, 2002)。実際、CAF(cancer associated fibroblast)や TAM(Tumor associated macrophage)と称される活性化された線維芽細胞やマクロファージなどが癌の進展を多面的に促進させ、抗癌剤耐性にも関与している(Kalluri R et al., *Nature Rev. Cancer*, 2006; Michele De Palma et al., *Cancer Cell*, 2013)ことが実証され、TME は癌治療の新たな標的として注目を集めている。TME をターゲットにした新規治療薬として、CD40 阻害薬や SSTR1 阻害薬、retinoic acid、pirfenidone(Camille et al. *EMBO Molecular Medicine*, 2015)などの有効性が基礎研究レベルで報告されている。また、Hedgehog pathway 阻害薬(Amakye et al., *Nat Med.* 2013)や細胞外マトリックスを標的としたヒアルロニダーゼ製剤(PEGPH20)(Jacobetz et al., *Cell*, 2013)も Preclinical study で非常に良好な治療効果を認めた。しかし、いずれの製剤も膵癌全体を対象とした臨床試験では有効性を示すことはできず、有効な Population を選別するためのバイオマーカーの同定が課題となっている。また近年、ゲノム情報を利用したがんと間質細胞間の相互作用解析(インタラクトーム解析)に関する報告が次々となされ始め(Zenggang Li et al., *Nature Communications*, 2017, Komura et al., *BMC Genomics*, 2016)、がんと微小環境の両方を標的とする治療法の探索が試みられている。

本研究により、がんゲノム医療が高精度化されると共に、大規模臨床試験段階で Failure した既存の候補薬剤の有効な Population を同定することが可能となり、より精緻な治療法をより多くのがん患者に届けることができるようになると思われる。

2. 研究の目的

がん細胞のゲノム情報とがん細胞を取り巻く微小環境のゲノム情報を合わせることでがんゲノム医療の精度を大きく向上させることである。具体的には、臨床で使用可能な bulk のがん組織を用いた RNA-seq データを数理的に各細胞グループに分離、分析する新規 Virtual dissection モデルを構築し、臨床での実装化を目指す。自施設の膵癌切除検体を用いた bulk RNA-seq、Single cell RNA-seq (scRNA-seq)の各データと膵癌 PDX モデルを用いたインタラクトーム解析の結果を統合し、NMF 法、Deconvolution 解析、CIBERSORT など様々な数理モデルを用いて、新規 Virtual dissection モデルの構築を行うことに学術的な独自性、創造性がある。さらに、本モデルによる解析結果に対して、TCNG(The Cancer Network Galaxy(ペイジアンネットワークによるがん統合分子ネットワークデータベース))を合わせることで、on-tumor で pathogenic に働いているがん-間質相互作用を同定することが可能となり、がん細胞と微小環境の両方を対象にした次世代がんゲノム医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1). Virtual dissection モデルの構築と Diver interaction の同定

膵癌オルガノイドおよび膵癌手術検体より virtual dissection を行うための細胞種の同定および細胞種の分画や発現量を deconvolution するための基準となる signature matrix の作成を行なった。

- Signature matrix の作成は single cell の発現量のデータを元に、主成分分析やクラスタリング解析によるクラス分類を行った。クラスタリング結果より、分類された single cell 細胞の個々の発現量のデータからクラスター毎に Signature を構築できる Cibersortx のアルゴリズムを採用し、細胞種ごとの Signature matrix を構築した。細胞種は DAVID や Metascape などのエンリッチメント解析により同定した。
- 癌細胞の性質の確認としてオルガノイドから得られた single cell と同時に取得したバルク RNAseq の発現量のデータ解析による膵癌の特徴を検討した。

(2). Virtual dissection モデルの検証

膵癌オルガノイドと同じ症例の膵癌組織やオルガノイドバルクサンプルに対して、構築した Signature matrix による細胞種の割合や発現量を求め、実際の標本から抽出できる情報とどの程度相関があるか検討した。また、TCGA などの外部データベースのバルク RNAseq の発現量での検討も行った。

(3). がん-間質相互作用同定に向けたネットワーク解析

共同研究者等が考案した TCNG (The Cancer Network Galaxy (ベイジアンネットワークによるがん統合分子ネットワークデータベース)) やそのアルゴリズムにより構築されたネットワークからがん-間質相互作用を抽出するようなサブネットワークの条件を検討した。

4. 研究成果

(1). Virtual dissection モデルの構築と Diver interaction の同定

(2). Virtual dissection モデルの検証

膵癌オルガノイドおよび膵癌組織の scRNA-seq による発現量のデータから個々および全てまとめた時のクラスタリング解析による細胞種のクラスタリング解析から、図 1-4 のようなクラスターを同定した。また、クラスターを構成する遺伝子とその発現を確認した。

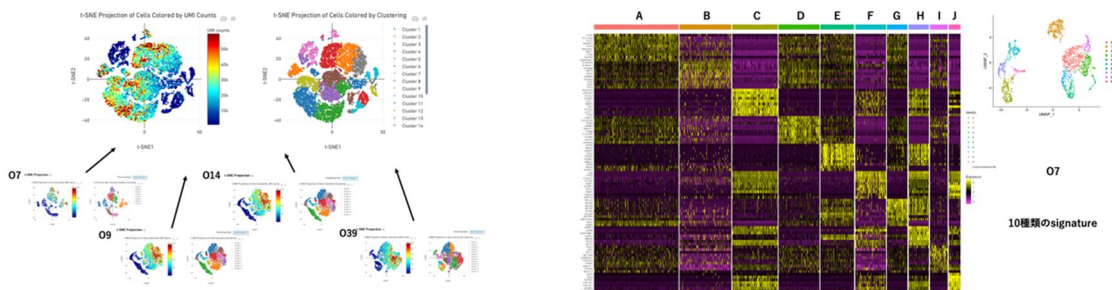


図 1. オルガノイドの t-SNE によるクラスタリング 図 2. 各クラスタリング代表する遺伝子発現のヒートマップ例



図 3. 今回の解析により得られた scRNA-seq によるクラスタリングと遺伝子発現のヒートマップ

	癌	癌	癌	リンパ球	リンパ球	リンパ球	癌	リンパ球	癌	癌	癌	リンパ球	リンパ球	正常
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	BA	BB	BC	BD
Mixture														
PanCa14N	0.04647462	0	0.10743579	0	0	0.03790478	0.0224809	0.00370459	0	0.1513887	0.10585856	0.13661435	0.05606732	0.3320704
PanCa14T	0.01605273	0	0.11050857	0	0	0.02613884	0.11343988	0	0	0.441649	0.09867545	0.0760866	0.09798331	0.01946562
PanCa39N	0.02882457	0	0.11222116	0	0	0.02790625	0	0	0	0.06539478	0.13405371	0.05162068	0.02556638	0.55441247
PanCa39T	0.03500124	0.14915199	0.02602945	0.00413076	0	0.02296033	0.01866016	0	0	0.45434589	0.13553038	0.04040621	0.1137836	0
PanCa7N	0.06638843	0	0.2030711	0.02395247	0	0.02742929	0.02348806	0	0	0.08829347	0.22350424	0.14154366	0.01499761	0.18733169
PanCa7T	0.02738783	0	0.25121882	0.02518011	0.00401703	0	0	0	0	0.23917076	0.23609685	0.10238264	0.11454594	0
PanCa9N	0.02660446	0	0.0238482	0.04065317	0.06387975	0.02445413	0	0	0	0.09057753	0.13416093	0.06022279	0.01175028	0.52384877
PanCa9T	0.04121455	0	0.07293839	0.06258796	0	0.02276147	0	0	0	0.41419322	0.18371506	0.08665881	0.11543939	0.00049114
PanOrg_14_bulk	0	0.315642	0.12932026	0	0.03847194	0	0	0.00541601	0	0.007899	0	0.01180909	0.49144172	0
PanOrg_9_bulk	0.13018576	0.0501588	0.30058366	0.02337614	0.11834527	0.01154381	0	0	0	0.04886448	0.05269013	0.04910878	0.21514317	0

図4. 構築した Signature matrix によるバルク腫瘍組織およびオルガノイドデータの細胞分画の割合

腫瘍組織は癌細胞に加えて、膵臓の正常な腺房細胞や間質細胞、免疫細胞も含むため、多くの細胞種を分類できる Signature matrix が必要となることが予想される。実際に、個々の症例やオルガノイド毎に検討を行って見ると、全ての解析ではなかったが、特に癌のモデルであるオルガノイドにおいてはこれまでに報告にあるような膵癌のサブタイプを分けられるような Signature matrix が得られた。また、すべてのデータセットを組み合わせた解析における Signature matrix は癌細胞、正常細胞や間質、免疫細胞といった細胞種が明らかに異なる遺伝子が選択されており、個々の解析でみられたような癌のサブタイプの情報は失われた。よって、症例毎の差はあるものの、個々で検討する方が、膵癌のサブタイプを分類できる可能性があることを見出した。今後の課題として引き続き、クラスターの分類の方法を検討し、更なる改善を行なっていく予定である。例えば、1段階で分類するよりは、多段階でクラスターの分類または遺伝子発現の分解を行うなど、分類したい細胞の細かいサブタイプまで同定したいのかなど、必要に応じたクラスターを使い分けていくことにする。

(3). がん-間質相互作用同定に向けたネットワーク解析

TCNG (The Cancer Network Galaxy (ベイジアンネットワークによるがん統合分子ネットワークデータベース)) やそのアルゴリズムにより遺伝子の発現量から構築されたネットワークからがん-間質相互作用を抽出するようなサブネットワークを構築するために、2群のデータセットを用いて検討を行った。

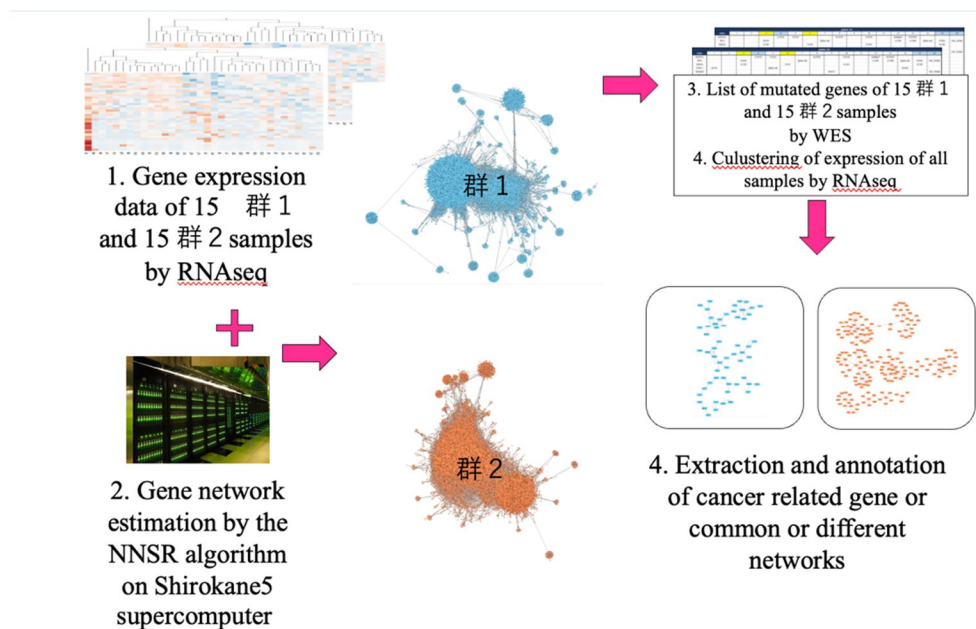


図5 サブネットワーク構築に向けた検討のスキム

本研究において、クオリティの高い scRNA-seq データの取得が難しいとされる膵癌において scRNA-seq データを取得し、細胞種の同定を行うことができたことに加え、そのデータからさまざまな細胞種の Signature matrix を構築することができた。しかしながら、細かい癌細胞のサブタイプまでを検討する場合は、オルガノイドなどのモデルからの構築されるようなサブタイプの分類が必要ながわかった。引き続き、Signature matrix の検討を行う必要があるが、がん-間質相互作用をネットワーク解析より抽出し、がん細胞と微小環境の両方を対象にした次世代がんゲノム医療の実現を目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rika Kasajima, Masaki Suzuki, Eigo Shimizu, Yoshinori Tamada, Atsushi Niida, Rui Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Satoru Miyano, Seiya Imoto, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi
2. 発表標題 Prediction of specific pathways in high grade fetal lung adenocarcinoma using gene network analysis
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠島理加
2. 発表標題 Predictive pathways involved in pathogenesis of high grade fetal lung adenocarcinoma using gene network analysis
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	井元 清哉 (IMOTO SEIYA) (10345027)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	
研究分担者	廣島 幸彦 (HIROSHIMA YUKIHIKO) (60718021)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・医長 (82713)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山口 類 (YAMAGUCHI RUI) (90380675)	愛知県がんセンター（研究所）・システム解析学分野・分野長 (83901)	

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