

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830141

研究課題名(和文) 一細胞シーケンシングによる、超早期発がん過程におけるがん細胞進化の解明

研究課題名(英文) Identifying cancer cell evolution from early stages of cancer progression by single-cell sequencing

研究代表者

加藤 護 (Mamoru, Kato)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：40391916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんがどのように生成され、進展していくのかが解明されれば、がんの適切な予防法や治療法に将来つながっていく。がんの生成・進展は、細胞レベルで見れば1細胞が細胞分裂を経てより強いものが生き残っていくため、ダーウィン進化にたとえられる。この進化を解明するには、経時的に1細胞ごとの遺伝的变化を追っていかねばならない。我々は本研究において、ヒト大腸癌の進展を模すマウス小腸発がん系において、がん進展3時刻点の各時刻点30細胞ほど、一細胞ごとのゲノムを抽出した。ゲノムを分析するには変異を同定する分析アルゴリズムが必要であるが、我々はこれを、アルゴリズム調整用に測定した一細胞ごとのゲノムデータを用いて開発した。

研究成果の概要(英文)：It is important to reveal how cancer is generated and progressed since this leads to better cancer prevention and treatment. Tumor progression can be viewed as a Darwinian evolution, where only fitter cancer cells proliferate more. The simplest way to analyze this process is trace the genetic changes of single cells along time. We used a mouse model for human colon cancer and extracted the genomes of 30 single cells at each of the 3 time points along tumor progression. An algorithm to identify single cell's variants is necessary for analyzing single cell genomes and we developed such an algorithm, using single cell sequencing data.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：一細胞シーケンス 次世代シーケンサー がんゲノム がん細胞進化

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーによってがんに必要な DNA 変異はカタログ化されてきたが、がん患者体内でがん細胞がどのように生じ、進化して悪性化するのかが解明されていない。がん細胞の発展や進化を解明するには、細胞一つ一つのゲノムを決定し、がんの一細胞を生物一個体のように見立てて分析することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト大腸がんのマウス・モデル系において、腫瘍発達段階に応じた時系列で腫瘍細胞を採取し、細胞一つ一つを一細胞シーケンシング技術で配列決定して、発がん超初期から悪性腫瘍に至る複数の段階におけるゲノム変異を調べ、がん細胞の系譜、および各段階でがん細胞増殖に益した遺伝子変異、腫瘍細胞集団の構成変化および臨床診断につながる性質の解明を目指す。

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は、最近ヒト大腸発がんの *in vitro* モデル系である「腸管発がん再構成系」を確立した(Onuma et al, PNAS, 2013)。これはマウス正常腸管細胞の3次元初代培養細胞に *Apc*, *p53*, *Pten* 等癌抑制遺伝子の shRNA を単独または組み合わせて導入することで、短期間でヌードマウス皮下腫瘍を形成する系である。

このモデル実験系を対象として、複数時刻点で一細胞シーケンシングを実施し、バイオインフォマティクスと集団遺伝学を駆使してデータ分析を行うことにより、大腸がんの腫瘍細胞進化、特に、これまで不明であった病変として現れる前のがんのゲノム変異と発がんのメカニズムを解明することができる。

4. 研究成果

1) ヒト大腸がんマウス・モデル系を使って、腫瘍進展3時刻点の各時刻点において、30細胞程度を自動細胞分離・調整装置 C1 によって、全ゲノム増幅後の DNA を抽出した。

2) マウス正常腸管細胞5細胞の一細胞シーケンスと比較のためバルク細胞のシーケンスを行った。マウス純系の細胞であるため、このデータは変異検出に対しネガティブ・コントロールとなる。

3) ポジティブ・コントロールとなる別の一細胞シーケンスデータと、上のネガティブ・コントロールデータとを合わせて用い、

1 細胞エキソーム・シーケンスデータ用変異検出のための最適なアルゴリズムを構築した。

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 9 件)

1) Motonobu Saito, Yoko Shimada, Kouya Shiraishi, Hiromi Sakamoto, Koji Tsuta, Hirohiko Totsuka, Suenori Chiku, Hitoshi Ichikawa, Mamoru Kato, Shun-ichi Watanabe, Teruhiko Yoshida, Jun Yokota, Takashi Kohno.

Development of Lung Adenocarcinomas with Exclusive Dependence on Oncogene Fusions. *Cancer Research*, 2015, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3282

2) Masataka Takenaka, Motonobu Saito, Reika Iwakawa, Nozomu Yanaihara, Misato Saito, Mamoru Kato, Hitoshi Ichikawa, Tatsuhiko Shibata, Jun Yokota, Aikou Okamoto, Takashi Kohno.

Profiling of actionable gene alterations in ovarian cancer by targeted deep sequencing. *International Journal of Oncology*, 2015,

3) Kousuke Ishino, Tatsuya Kato, Mamoru Kato, Tatsuhiko Shibata, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama, Yukari Totsuka.

Int. J. Mol. Sci., 2015, 16, 3474-3492

4) Yasushi Totoki, Kenji Tatsuno, Kyle R Covington, Hiroki Ueda, Chad J Creighton, Mamoru Kato, Shingo Tsuji, Lawrence A Donehower, Betty L Slagle, Hiromi Nakamura, Shogo Yamamoto, Eve Shinbrot, Natsuko Hama, Megan Lehmkuhl, Fumie Hosoda, Yasuhito Arai, Kim Walker, Mahmoud Dahdouli, Kengo Gotoh, Genta Nagae, Marie-Claude Gingras, Donna M Muzny, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Yutaka Midorikawa, John A Goss, Ronald Cotton, Akimasa Hayashi, Junji Shibahara, Shumpei Ishikawa, Jacfranz Guiteau, Mariko Tanaka, Tomoko Urushidate, Shoko Ohashi, Naoko Okada, Harsha Doddapaneni, MinWang, Yiming Zhu, Huyen Dinh, Takuji Okusaka, Norihiro Kokudo, Tomoo Kosuge, Tadatoshi

Takayama, Masashi Fukayama, Richard A Gibbs, David A Wheeler, Hiroyuki Aburatani & Tatsuhiko Shibata.

Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes.

Nature Genetics, 2014, 46, 1267-1273

5)Tatsuji Mizukami, Kouya Shiraishi, Yoko Shimada, Hideaki Ogiwara, Koji Tsuta, Hitoshi Ichikawa, Hiromi Sakamoto, Mamoru Kato, Tatsuhiko Shibata, Takashi Nakano, Takashi Kohno,

Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma.

Journal of Thoracic Oncology, 2014, 9, 622-630.

6)Shintaro Fukushima, Ayaka Otsuka, Tomonari Suzuki, Takaaki Yanagisawa, Kazuhiko Mishima, Akitake Mukasa, Nobuhito Saito, Toshihiro Kumabe, Masayuki Kanamori, Teiji Tominaga, Yoshitaka Narita, Soichiro Shibui, Mamoru Kato, Tatsuhiko Shibata, Masao Matsutani,

Ryo Nishikawa, Koichi Ichimura, On behalf of the Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (iGCT Consortium)
Mutually exclusive mutations of KIT and RAS are associated with KIT mRNA expression and chromosomal instability in primary intracranial pure germinomas
Acta Neuropathologica, 2014, 127, 911-925

7)Yusuke Suenaga, S. M. Rafiqul Islam, Jennifer Alagu, Yoshiki Kaneko, Mamoru Kato, Yukichi Tanaka, Hidetada Kawana, Shamim Hossain, Daisuke Matsumoto, Mami Yamamoto, Wataru Shoji, Makiko Itami, Tatsuhiko Shibata, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Seiki Haraguchi, Atsushi Takatori, Akira Nakagawara.

NCYM, a de novo evolved protein,

stabilizes MYCN and characterizes human neuroblastoma.

PLoS Genetics, 2014, 10, e1003996.1-14

8)加藤 護、「一細胞ゲノム解析」、医学の歩み、2014, 249, 1088-1092.

9) 翻訳：加藤 護、「発がんドライバー変異の同定」 by David Tamborero, Abel Gonzalez-Perez and Nuria Lopez-Bigas, 実験医学、2014, 32, 213-219

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
加藤護 (Mamoru Kato)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：40391916

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者

柴田龍弘 (Tatsuhiko Shibata)
独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・分野長

研究者番号：90311414