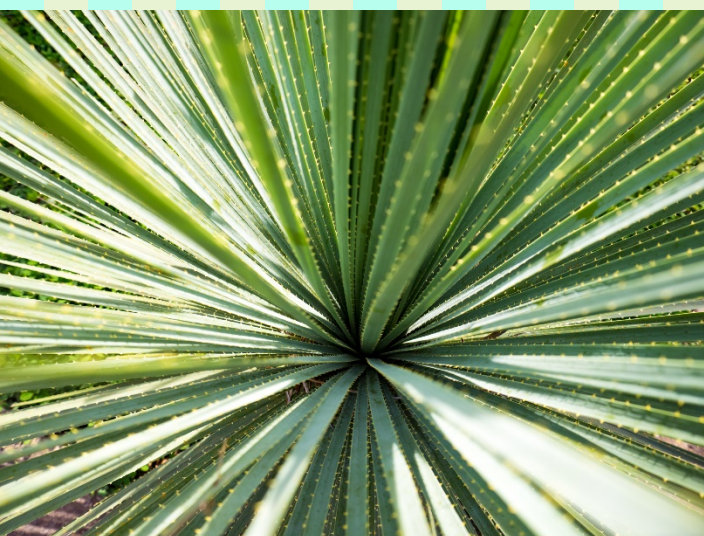




システム癌
新次元

がんシステムの新次元俯瞰と攻略

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 (研究領域提案型)(複合領域:4701)



Newsletter No. 11

2017年6月

CONQUERING CANCER THROUGH
NEO-DIMENSIONAL SYSTEMS
UNDERSTANDING

公募研究

個体モデルを用いた大規模シングルセル解析 によるがん組織の要素還元論的な理解

公募研究 A01-11-16 研究代表者

国立がん研究センター研究所 分野長 岡本 康司



研究の背景

がん組織を構成する細胞は、がん細胞だけではなくありません。がん細胞以外に、骨髄から遊走してくる様々な免疫系の細胞、線維芽細胞や、血管内皮細胞などが、混在しています。最近の研究により、がん細胞は、周囲を取り巻くこれらの非がん細胞の特性に影響を与え、自らの生存に有利な環境を作り出している事がわかってきました。例えば、免疫系のマクロファージやT細胞の多くは、がんを抑える働きを持っていますが、がんの進展に伴い、むしろがん細胞の増殖を助ける種類の細胞が増加します。同様に、がんの進展に伴い、がん増殖を助ける線維芽細胞が出現しま

す。このように、がん細胞は周りの細胞の特性を変え、「共犯者」にしたてあげる事により、自らに都合の良い微小環境を作りあげています。

がんの進展に伴い、がんを取り巻く非がん細胞には上述のような様々な変化が起きますが、これら非がん細胞だけでなく、がん細胞自体にも様々な変化が起きます。がん細胞は均一な細胞の集団でなく、中には幹細胞の特性を持った細胞やある程度分化した細胞が混在しており、その中でも幹細胞の特性を持った細胞は、がんの転移能や抗がん剤の抵抗性の源となっていると考えられています。つまり、がん細胞は、ある程度の階層性を持って構成

されていると考えられます。これに加えてがん進展に伴うゲノム異常の蓄積もがん細胞の多様性に貢献しています。

このように、がん組織は、がん細胞と非がん細胞から構成される複雑な共生体を形作っています。このコミュニティを構成する細胞を同定し、その中で起きている相互作用の全体像を理解する事、さらにがんの進展に伴い、これらのコミュニティにどのような変化が起こるか、その全体像を理解する事は、がんの治療抵抗性や増殖能等、がんの難治性を理解するためにも重要です。

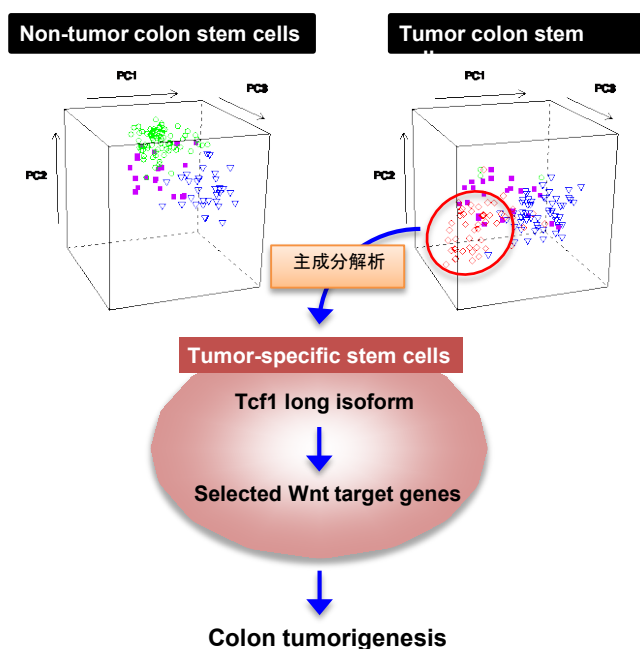


図1: シングルセル解析によるがん幹細胞の発生メカニズム解明

研究の概要

がん組織の全体像を理解する上で、従来行われてきた病理学的、生化学的な研究のみでは、なかなか難しい面がありました。そこで我々は、シングルセル解析という新しい手法により、がん組織の全体像の理解に取り組んでいます。

この方法論では、がん組織を構成する細胞を、酵素処理などにより単離した後、それぞれの細胞の遺伝子発現プロファイルを調べます。遺伝子発現測定を数百～数千細胞で行ったのち、これらの結果の統計的解析により、がん組織を構成する細胞群を同定し、さらに同定した各細胞群がどのような発現特性を示すか決定します。最後に、これらの結果を時系列で解析する事により、発がん過程の理解、がん組織の全体像の時空間的な俯瞰を試みます。このようにして得られた知見は、最終的には新たな発がん予防概念の構築、難治がんの治療標的の同定等を介して、新たな治療戦略の礎となる事を期待しています。

本研究においては、マウスの大腸発がんモデルを主な解析対象として用います。このモデルで、がん進展に伴う、がん細胞、及びがんを取り巻く非がん細胞の動態を

シングルセル解析で調べます。

別の研究計画としては、ヒト大腸がん、卵巣がんのマウス移植腫瘍を用いた解析も行なっています。最近我々の研究室で、これらのがん腫由来のがん幹細胞のインビトロ培養系を確立しましたが、これらの細胞のマウス移植により、原発がんと同様した病理像を示す腫瘍の再構成が可能です。これらの腫瘍モデルを用いたシングルセル解析も行います。

シングルセル発現解析による発現レベルの定量法としては、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析の他に、解析遺伝子数が限られるものの感度定量性に優れる定量 PCR 解析も、状況に応じて行います。シングルセル解析データの定量、統計的解析は、国立がん研究センター、東京大学新領域創成科学研究科の専門家との協力のもと行います。

最近の研究成果

(1) 大腸がんのマウス発がんモデルにおいて、がん細胞中に存在する幹細胞のシングルセル発現解析を、定量 PCR 法を用いて行いました。その結果、幹細胞の中で造腫瘍性を持った幹細胞が、がん化に伴い出現する事が明らかになりました。また、これらのがん幹細胞の出現過程で、

一群の Wnt シグナル下流遺伝子の発現誘導が起きる事、とりわけこれらの下流遺伝子の中でも、Tcf1 の発現が、がん幹細胞の出現に必須である事がわかりました。これらの知見は、大腸発がんの重要なメカニズムの一部であると期待されます (Shiokawa et al., Cell Reports, 2017) (図 1)。

(2) 大腸がんのマウス発がんモデルにおいて、がん周囲の非がん細胞を含めたがん組織の大規模なシングルセル発現解析を行っています。これらの解析により、がん細胞により引き起こされる、がん組織内の微小環境の動態が明らかになると期待されます。

(3) ヒト大腸がん、卵巣がんのマウス移植腫瘍を用いた、がん細胞のシングルセル発現解析を行っています。最近、大腸がん、及び卵巣がん由来のがん幹細胞のインビトロ培養系(スフェロイド培養法)の樹立に成功しましたが (Ohata et al., Cancer Res, 2012; Ishiguro et al., Cancer Res, 2016; Ishiguro et al, Cancer Sci, 2017)、これらを免疫不全マウスに移植する事により原発腫瘍の再構成が可能になります (図 2)。これらの移植腫瘍モデルを用いたシングルセル解析を行っています。

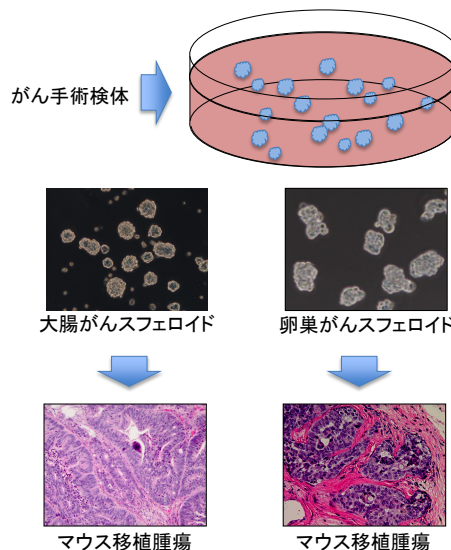


図2: がん幹細胞様細胞のマウス移植によるがん組織の再構成

公募研究

粘膜上皮恒常性維持の破たんによる 腫瘍発生機序のシステムの理解

公募研究 A02-1-16 研究代表者

東京大学医科学研究所先端医療研究センター臨床ゲノム腫瘍学分野 教授 古川 洋一



この研究プロジェクトは、遺伝性腫瘍である家族性大腸腺腫症と一般の大腸がんの原因に同じ遺伝子 APC が関与することに端を発します。この発見は、私が遺伝子の研究を始めた時の指導者である中村祐輔博士らによるものです。アメリカの Eric R. Fearon 博士と Bert Vogelstein 博士が 1990 年に提唱した、大腸がんの multistep carcinogenesis モデルの最初のステップが、この APC 遺伝子の変異だったわけです。このモデルでは、KRAS 遺伝子や TP53 遺伝子など少数の遺伝子変異が、大腸腺腫からがんへの進展にかかわっているとされています。しかしこの 27 年間に遺伝子変異の解析技術が格段に進歩し、次世代シーケンサーを用いた解析により、がんゲノム全体の塩基配列を把握できるようになりました。その結果、大腸がん細胞には数千から数十万もの膨大なゲノム変異が存在すること、そして前がん病変の大腸腺腫にも多くの変異が存在していることが明らかにされました。これらの変異は一度に起こったのではなく、数年～十数年にかけて細胞に蓄積したも

のです。ではいつ、どのようにして起こったのか、そしてこれらの変異が腫瘍の発生・進展あるいは性質にどのように影響しているのか、これらを明らかにするのが本研究の第一のテーマです。また、別の遺伝性腫瘍であるリンチ症候群の研究から、前述の multistep carcinogenesis モデルには当てはまらない、腫瘍発生メカニズムがあることも明らかになりました。それは、遺伝子修復にかかわるミスマッチ修復遺伝子群の変異、あるいはミスマッチ修復遺伝子の発現制御異常により、多くのゲノム変異が蓄積して腫瘍化を誘導する機序です。このような現状から、粘膜に存在する細胞が腫瘍へと変化しさらに悪性化する過程で、APC 変異に依存しない発がんメカニズムを解明しようというのが、本研究の第二のテーマです。

第一のテーマでは、家族歴がない家族性大腸腺腫症一例の患者の複数の腺腫をまず調べ、APC 遺伝子の異常がどの腫瘍細胞にも 1 か所または 2 か所に存在すること、そのうち一方の異常がすべての腫

瘍で共通しており、この変異は調べたすべての正常細胞にわずかながら異なる割合で存在することから、受精卵形成後の早期に起こった体細胞モザイク変異であることを発見しました(図1)。このことは、遺伝子変異は受精後いつでも、どの細胞にも起こり得るということを示しています。それまで学生の講義で、すべて正常細胞が親から受け継いだ同じゲノムを持っていると説明していた私には、とてもショッキングな発見でした。正しくは、我々個体は両親から受け継いだゲノム配列に加え、様々な変異が加わっているかもしれない細胞集団の集まりで、腫瘍細胞はもちろん正常細胞も異なるゲノムを持つかもしれないと説明すべきでしょう。さらに前述の家族性大腸腺腫症患者の腺腫を調べると、各腫瘍で約 5000～9000 か所に体細胞変異が検出されました。これらの変異が起こったタイミングは、腫瘍形成の前なのか後なのか、さらにその変異は腫瘍にどのような影響を及ぼすのかについて、現在解析中です。

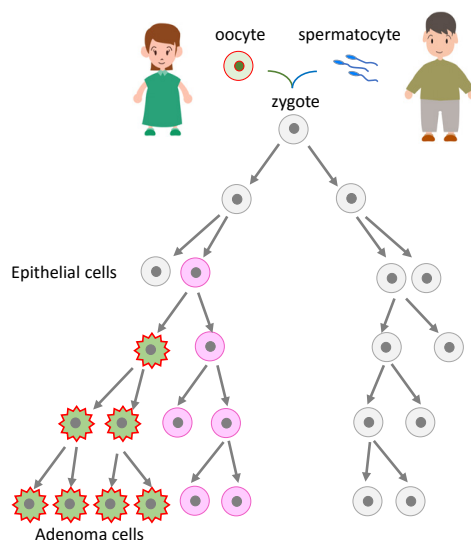


図1

第二のテーマでは、腹膜偽粘液腫（pseudomyxoma peritonei: PMP）という100万人に1～2人の珍しい病気の腫瘍について遺伝子解析を行っています。PMPの腫瘍は虫垂に原発することが多く、しかも見つかった時には腹膜転移（播種）しているために、ゼリー状の物質が腹腔内に蓄積しています（図2）。この腫瘍細胞を調べると、KRASとGNAS遺伝子の異常が高頻度で見つかります。しかし、大腸がんの8割以上に認められるAPC遺伝子の異常がほとんどありません。この腫瘍にどのような遺伝子異常が蓄積してい

るのかを調べることで、腫瘍発生・進展（特に腹膜転移）のメカニズムを解明しようと現在研究を行っています。すでに我々は低悪性型PMPと高悪性型PMPを比較し、どちらの腫瘍にもKRASとGNAS遺伝子の異常がほぼ同じ頻度で存在すること、低悪性度PMPに比べ高悪性度ではTP53の変異とPI3K-AKT経路の異常が多いことを見出しています（図3）。これらの解析を進めて、腫瘍形成に関わる変異、形成後に起こる変異と、腫瘍細胞や浸潤など周囲組織への影響を解明したと考えています。

いずれのテーマも全ゲノム解析を中心にして研究を実施しています。全ゲノム解析にはスパコンを用いた解析が必須で、本研究領域の中での共同研究を生かして研究を推進しています。単にタンパクに翻訳される遺伝子内の変異だけでなく、構造異常や非翻訳領域の変異などの意義も明らかにしたいと考えています。また一部のPMP患者さんには、遺伝子変異から人工知能を用いた治療薬予測も開始しました。メカニズムの解明とともに、ゲノム解析データの臨床応用も展開していく予定です。

Classification		DPAM										PMCA							
Sample number		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8
Mutated status	KRAS																		
	GNAS																		
	TP53																		
	PIK3CA																		
	AKT1																		
	SMAD4																		
	NRAS																		
	PDGFRA																		
	RET																		
IHC	VHL																		
	p53																		

図2

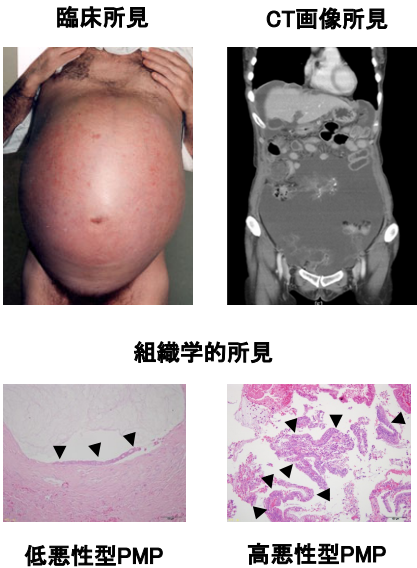


図3

Information



Human Genome Center

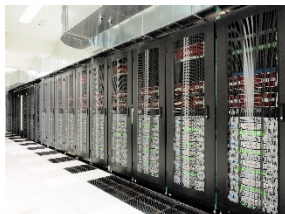
東京大学医科学研究所

ヒトゲノム解析センタースーパーコンピュータ

システム癌新次元で用いられるデータ解析ソフトウェアは、ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータで動いています。スーパーコンピュータはどなたでもご利用になれます(有償)。



大容量のディスク装置



高密度の計算機

<http://supcom.hgc.jp>



システム癌
新次元

<http://neosystemscancer.hgc.jp/>

新学術領域研究「システム癌新次元」ニュースレター No. 11

発行日★平成29年6月4日(初版)

発行★がんシステムの新次元俯瞰と攻略

領域代表者★宮野 悟

- 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター DNA情報解析分野
- 〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
- TEL: 03-5449-5615 FAX: 03-5449-5442
- E-mail: miyanolab-jimu@edelweiss.hgc.jp