



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. 18

CONQUERING CANCER THROUGH NEO-
DIMENSIONAL SYSTEMS UNDERSTANDING

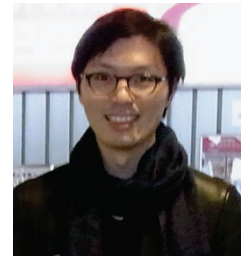
2019年4月

公募研究

シングルセルレベルの腫瘍内不均一性をターゲットとする革新的な創薬研究

公募研究 A01-7-18 研究代表者

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 教授 田中 伸之



膀胱がんは米国NCIが示す世界的な common cancer の1つであり、泌尿器がんの中でも特に難治性です。膀胱がんは免疫治療の先駆けであり、例えばハイリスク表在性膀胱がんに対するBCG(ウシ型弱毒結核菌)膀胱内注入療法の歴史は、1970年代まで遡ります。最近の膀胱がん免疫治療の関心は、2018年ノーベル医学生理学賞の影響もあり、切除不能・転移性膀胱がんに対する抗PD-1療法です。同治療の知見は、全てのがん臨床・研究に波及効果を持ちます。一方、免疫治療例は10-20%で完全寛解を認めますが、多く

は一時的な奏功で、間もなく再燃し耐性化します。この膀胱がん免疫治療の臨床像「奏功→再燃→耐性化」は、がん幹細胞が紡ぎ出す「がん組織多様性」が関与すると考えます。

これまでのがん研究は、腫瘍を細胞の総和(1つの集団)あるいは一つの構造体と解釈してきました。しかし、実際にはがんは同一患者、更には同一腫瘍においても不均一であり、そのがん組織多様性は1細胞並びに脈管や層構造が織りなす微小環境に及びます。また治療中の腫瘍組

織では、がん細胞に生じる遺伝子・エピジェネティック変異に加え、再燃過程で微小環境にも様々な構造変化が起こります。これら複合的な圧力を原因とする細胞ヒエラルキーの構築は、最も生存に適応し得る治療抵抗能の最適化、即ち特定のがん細胞増殖を促し、この細胞ヒエラルキーの最上位に、がん幹細胞が君臨すると考えられます。では、治療後に生き永らえる細胞を産み出すがん幹細胞はどのような特徴を有し、どこ(どのような微小環境)に生息するのでしょうか？

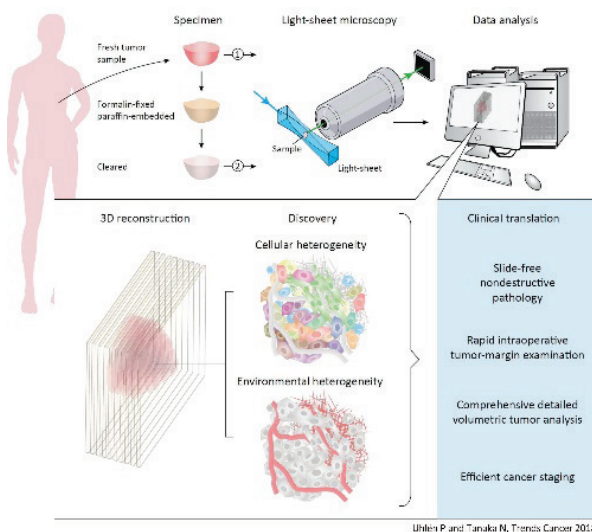
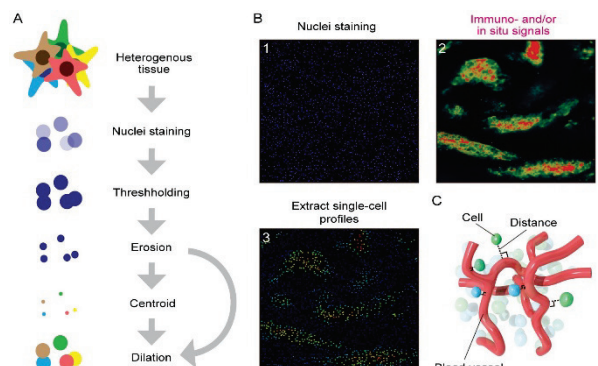


図1: ライトシート顕微鏡を利用した臨床病理学検査の概略。矢印1は腫瘍組織の迅速検査を示し、矢印2は透明化された固定組織への免疫組織学的アプローチを示す。

図2: 腫瘍空間に存在するシングルセルを特徴付ける画像パイプライン。A-B: 1細胞レベルでタンパク・遺伝子発現を決定する解析アルゴリズム。C: 立体的ながん微小環境を定量化する1細胞レベルの距離分析。



ライトシート顕微鏡はこれまでの顕微鏡概念を覆す最新の研究手法です。透明化された腫瘍塊は1細胞レベルの解像度で、組織深部まで可視化されます。従来の免疫組織学的アプローチは、得られた腫瘍組織を薄い切片(通常10μm以下)にするため、大部分のタンパク・遺伝子の立体的な発現情報は、分析の過程で失われていました。がん微小環境における3次元情報(脈管の立体構造、層構造、細胞ニッチ等)の欠如は、がん組織多様性の全容解明に致命的と考えます。一方、ライトシート顕微鏡で可視化される腫瘍空間は、ミクロな細胞の位置情報・組織構造は保持され、標的分子の発現レベルに応じる3次元マップの作成が可能です。これまで我々は、ヒト腫瘍塊に対する免疫染色・透明化技術を3次元で最適化し、ライトシート顕微鏡で撮影を行うDIPCO法を考案しました。DIPCO法はパラフィン包埋されたヒトアーカイブサンプルにも応用され、1細胞レベルで腫瘍内のタンパク発現、立体的ながん微小環境の再現が可能です(図1)。最新の成果では、組織塊へのin situ hybridizationによる3次元なRNA分布の可視化にも成功しており、例えばシーケンスで得られるがんトランスクリプトームを立体的な腫瘍へ投射することで、特定の遺伝情報

を持つクローン(がん幹細胞等)の同定が可能となります。図2は腫瘍空間に存在するシングルセル(がん細胞)に定量的なタンパク・遺伝子の発現レベルを付与するための画像解析アルゴリズムです(図2A-B)。1細胞毎に細胞の位置情報を付与することは、組織内で拡がる腫瘍血管との距離も3次元で測定可能にし、血管周囲の傍血管ニッチの同定も自動化されます(図2C)。

本研究で我々は、難治性膀胱がん創薬研究の新規アプローチとして、このライトシート顕微鏡とシングルセルRNAシーケンスの融合を計画しました(図3)。シングルセルRNAシーケンス単一細胞に含まれる微量RNAから、網羅的な遺伝子発現解析を可能にする研究手法です。腫瘍内に存在する多種多様な細胞から、シングルセルRNAシーケンスで1細胞毎にRNAプロファイルを取得する事は、がん組織多様性を解明する上で鍵となる、がん幹細胞を可視化します。一方、最新のシングルセルRNAシーケンスでは、サンプル調製過程の1細胞分離で組織は破壊されてしまうため、立体的な腫瘍内でがん幹細胞の位置情報を取得することが難しくなります。ライトシート顕微鏡が映し出す透明化された腫瘍では、シングルセルRNAシーケンス

で得られるがん幹細胞の表現型が忠実に再現されます。我々はこの次世代イメージングを駆使して、がん幹細胞が生息する細胞ニッチやがん微小環境でこそ維持される幹細胞性の機構解明等、がん幹細胞根絶を可能にするブレイクスルーを得たいと考えております。

がん免疫治療(抗PD-1抗体療法)の治療費は1人当たり年額一千万円を超え、医療経済の観点からも対応が急務です。生体内で複雑化するがん組織多様性の可視化は、「がん幹細胞を含む多様な細胞集団がいかに治療耐性を獲得するか」を解き明かす分子基盤であり、がん免疫療法の正確な効果予測やがん組織多様性を利用した新規治療の開発が期待されます。本研究で我々が用いる「シングルセルRNAシーケンス・ライトシート顕微鏡」は、がん研究への適用自体が革新的です。即ち、これら2種の新しい研究手法の親和で対峙するがんビッグデータは、「システム癌新次元」というプロジェクトにおいて、多分野の連携、特にがん治療学・生命情報科学・コンピュータ科学の協働が解析プラットフォームの確立に不可欠と考えます。

< 革新的な研究アプローチ >

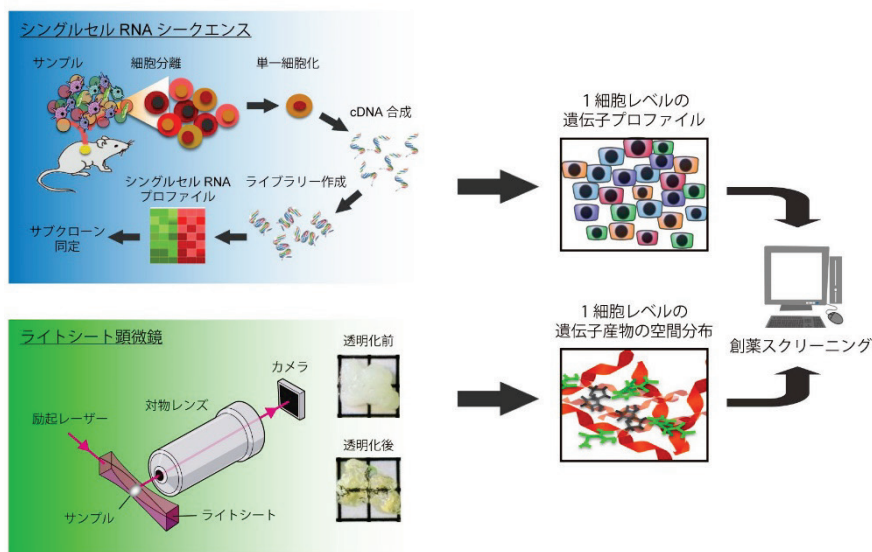


図3: シングルセル解析による難治性泌尿器がん克服へ向けての創薬研究

公募研究

成人T細胞白血病リンパ腫における
ノンコーディングゲノム異常の解明

公募研究 A01-8-18 研究代表者

国立がん研究センター研究所分子腫瘍学分野長 片岡 圭亮

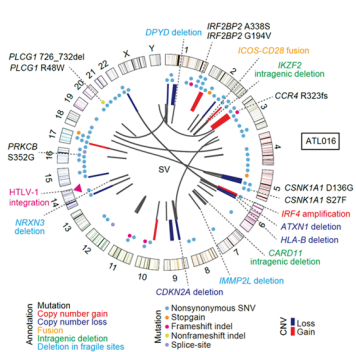


成人T細胞白血病リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATL) はヒトT細胞白血病ウイルス1型 (human T-cell leukemia virus type1; HTLV-1) というウイルスを原因とするT細胞の腫瘍です。ATLは既存の抗がん剤に抵抗性を示す極めて予後が悪い悪性腫瘍であり、HTLV-1ウイルスに感染している方 (HTLV-1キャリア) が本邦に多いため、本疾患も日本に多い疾患です。そのため、ATLの病態の解明や治療方法

の改善は、わが国で取り組むべき課題であると考えられます。

これまで、我々のグループを中心として、全エクソン解析やRNAシーケンスといった最先端の遺伝子解析技術を用いた研究が行われて、本疾患における遺伝子異常の全体像が解明されてきました (K Kataoka, Nat Genet, 2015)。具体的には、ATLではT細胞受容体 (TCR) シグナリング/NF-κB経路という特徴的な分子群に高度

の遺伝子異常の集積を認めました。この経路では、*PLCG1*、*PRKCB*、*CARD11*などを活性化させる遺伝子変異や *CTLA4-CD28/ICOS-CD28* 融合遺伝子などの多数の新規の遺伝子異常が認められました。さらに、昨年ノーベル賞を受賞された本庶佑先生が発見されたPD-1に結合する分子であり、近年、免疫チェックポイント阻害剤の標的として注目を集めているPD-L1の活性化を引き起こすゲノム異常も見出されました (K Kataoka, Nature, 2016)。



K Kataoka, 2015 Nat Genet

これまでの遺伝子解析

- ・ コーディング領域の変異
- ・ コピー数異常 (増幅・減少)
- ・ 構造異常 (転座・逆位・欠失・増幅) が中心

↓
未解明のゲノム異常が残されている。

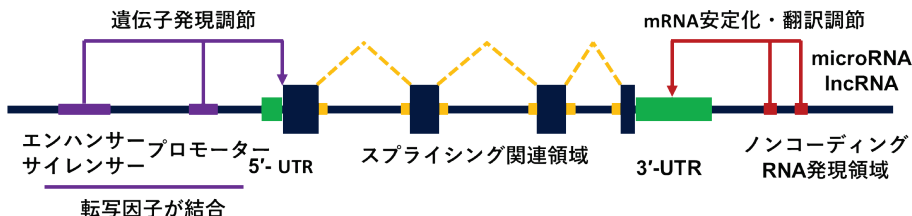
- ・ ノンコーディング領域の変異
 - 遺伝子発現調節領域
 - スプライシング関連領域
 - 非翻訳領域
 - ncRNA発現領域 など

↓
全ゲノムシーケンスによる全貌の解明を目指す。



© 2016 DEGLS 統合TV / CC-BY-4.0

遺伝子異常の対象となるノンコーディングゲノム領域



このようにATLの遺伝子解析は精力的に進められてきたのですが、未だ十分に解明されていない箇所が残されています。ヒトゲノムは、遺伝子をコードする部分であるコーディング領域と、それ以外の領域であるノンコーディング領域に分けられます。このノンコーディング領域には、遺伝子の発現量を調節する機能を持つプロモーターやエンハンサー／サイレンサーと呼ばれる領域、スプライシング（DNAからの転写で合成されたRNAから蛋白を作るために不要な部分を取り除かれる過程）を制御する領域や、microRNAやlong non-coding RNA (lncRNA) などの十分に機能が解明されていないRNAを発現する領域などが含まれます。これまでのATLの遺伝子解析研究はコーディング領域の解析が中心であり、このノンコーディング領域は十

分に研究されていませんでした。

そのため、本研究においては、ATLにおいてノンコーディング領域の遺伝子異常を明らかにすることを試みます。この目的の達成するためには、これまでとは異なる遺伝子解析技術を用いる必要があります。具体的には、ATL患者検体を用いて、十分な深度（同じゲノム領域を繰り返し読む回数）で全ゲノムシーケンス解析を行う予定です。その結果、得られた大量のデータをスーパーコンピュータやクラウドコンピューティング（インターネットなどのコンピュータネットワークを経由して、コンピュータ資源を利用する方法）を用いて解析することにより、ノンコーディング領域の遺伝子異常を網羅的に探索することを目指します。さらに、これまでの遺伝子解析の結果と合わせて統合的に理解することにより、ATL

の遺伝子異常の全体像を明らかにします。また、新規の反復する遺伝子異常が認められた場合には、機能解析を併用することにより、ATLの発症や進展における役割を解明することを試みます。これらの成果は、将来的には、未だ治癒することが困難なATLという疾患の診断や治療の改善に繋がることが期待されます。



Information

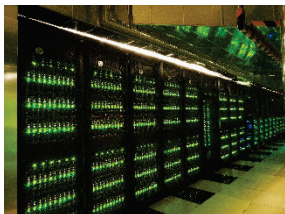


Human Genome Center

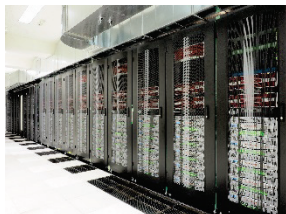
東京大学医科学研究所

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



システム癌
新次元

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

supcom.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. 18

発行日★平成31年4月21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