

課題番号 : 29指2012
研究課題名 : 1細胞解析による肝がん構成細胞の系譜解析を基盤とした新規治療法の開発
主任研究者名 : 溝上雅史
分担研究者名 : 長谷川潔、牛久哲男
キーワード : 1細胞解析、ウイルス性肝炎、非ウイルス性肝炎、肝がん、切除肝
研究成果 :

本研究では、現在我々が取り組んでいる1細胞での全RNAシーケンス解析技術(single cell RNA sequence: scRNA-seq)を最大限に活かして、ウイルス性もしくは非アルコール性脂肪性由来肝がんを構成する肝実質細胞・非実質細胞について、1細胞レベルで網羅的な遺伝子発現データを取得し、データベース(DB)化する。このscRNA-seqデータに基づいて、肝がんを生物的な性質に沿って分類し、治療法の開発をする点が新規性であり、革新的な点でもある。各分類に特徴的な遺伝子を抽出することで、遺伝子発現データに基づいた、現行の治療法(化学療法、分子標的治療等)の最適な選択や他癌における治療薬の適応拡大、そして、特徴的な分子を標的とした新規治療法の開発を行なう。この遺伝子発現情報は、分子マーカーとしても利用できるため、現行や新規の治療適応を診断する上で重要な診断薬の開発にもつながる。

初年度計画として、がん部/背景肝のペア検体収集の目標は、B型肝炎由来肝がんの肝硬変あり/なし、C型肝炎由来肝がん、非アルコール性脂肪性肝炎由来肝がん(非B非C型肝炎由来含む)の検体収集とscRNA-seqを予定した。その結果、国立国際医療研究センターと東京大学医学部附属病院において、B型肝炎由来で肝硬変あり、肝硬変なしのそれぞれについて、計画した症例数の収集とscRNA-seqを予定通りに実施した。C型肝炎由来でも国立国際医療研究センターと東京大学医学部附属病院で予定症例数を収集し解析に供した。非アルコール性由来についても同様に進め、予定症例数を超える検体の収集と解析を進めた。

検体収集と処理では、本研究用に独自に開発した処理方法を利用し、scRNA-seq用に生組織を即日処理し、高品質のサンプルを確保した。scRNA-seq処理では、ライブラリーの品質確認を各ポイントで実施し、精度の高いライブラリーを用意し、NGSによるデータ取得を行った。肝硬変を有するB型肝炎由来肝がんの検体は、症例数が多くないため、検体収集が順調には進まない可能性予想されていたが、それ以外の症例については、ほぼ目標設定どおりである。特に非アルコール性由来肝がんは、既に二年目の目標数に達した。継続して、翌年度も検体収集を進める。二年度目からは、B型肝炎由来肝がんの症例を多く有する新しい共同研究先と協力研究者として加える予定であり、検体収集が加速する予定である。

初年度のscRNA-seqのデータベース化の計画では、1)臨床データ、治療の予後データ、scRNA-seqデータを患者ごとに集約したDB構築を進めた。臨床データについては、現有の国府台病院バイオバンクDBと肝炎DBを基本にDBを設計し、そこに患者ごとにscRNA-seqデータを対応させる形とした。scRNA-seqDBでは、パイプライン化した解析機能として、scRNA-seqデータの主成分分析機能の開発を進めた。2)グループ化とその解析機能として、1)で得られた主成分分析と関連解析データを元に、類似したプロファイルを示す症例のグループ化を行い、グループ間での比較解析を行える機能の開発を進めた。それによって、各グループに特徴的な遺伝子や臨床情報の抽出が可能となる。同一患者での多発肝がんの比較を行うために、肝がん部と背景肝それぞれについても、比較解析できるプログラム設計を進めた。3)アノテーション機能として、各グループの特徴データを元に、機械処理による文献のテキスト検索、外部DB(GEO、TCGA、GDC portal等)との発現データ比較を行える機能の開発を進めた。

分子マーカー探索とその機能解析についての初年度計画は、DB解析で得られたデータから、予後予測に有効な分子マーカーの抽出を行い、実用性を後ろ向き試験で評価する準備を進めることである。現在、症例数が揃いつつある非アルコール性肝炎由来の肝がん、優先してscRNA-seqデータの解析を進めた。今後、早期診断や予後予測マーカーとなり得る分子を抽出して、保存した肝組織や血清で検証を進める。

Subject No. : 29shi2012
Title : Development of a novel therapy based on single cell RNA-seq data of hepatocellular carcinomas
Researchers : Masashi Mizokami
Key word : single cell analysis, viral hepatitis, non-viral hepatitis, hepatocellular carcinomas, liver resection
Abstract :

We have developed the single cell RNA sequence technology (scRNA-seq) using clinical organ samples. We focused on viral or nonalcoholic steatohepatitis (NASH)-derived hepatocellular carcinomas. Briefly, we collected hepatic parenchymal and non-parenchymal cells at a single cell level by the preparation of liver organ. These comprehensive gene expression data was acquired at the single cell level by NGS. These data were registered into our database (DB). On the basis of this scRNA-seq data, both an optimal selection of current therapies (chemotherapy, molecular target therapy) and an expand indication of the existing drug are planned in the present study. Since a gene expression data related with disease progression or treatment response is a molecular marker, the expression testing could be important for the diagnosis.

In this year, the goal of sample collections is to obtain paired samples of cancer and background liver, hepatitis B-derived HCC with or without cirrhosis, hepatitis C-derived HCC, and NASH-derived HCC (including non-B non-C hepatitis). As a result, the planned number of samples was collected at National Center for Global Health and Medicine and the University of Tokyo. These paired samples were analyzed by single cell preparation and scRNA-seq.

On the database construction of scRNA-seq in the first year, 1) We proceeded with the construction of a database in which clinical data, prognostic data of treatment, and scRNA-seq data. Especially, clinical data was collected from the existing Biobank DB and hepatitis DB. The pipelined program for the analyses of scRNA-seq data were conducted in DB. We also constructed the principal component analysis function of scRNA-seq data. 2) Based on the principal component analysis, patients showing similar profiles of scRNA-seq data are grouped. This grouping analysis makes it possible to extract specific clinical and gene information on each group. 3) As a function of the annotation, we developed the function of text search by machine processing and constructed to compare expression data with external DB (GEO, TCGA, GDC portal).

Our plan is to extract useful molecular markers for the prediction of the prognosis based on the obtained scRNA-seq data and to evaluate the practicality in retrospective tests. In this year, we analyzed scRNA-seq data of HCC derived from NASH or non-A non-B HCC. We will extract candidate molecules that could be early diagnosis and prognostic markers.

Researchers には、分担研究者を記載する。

研究概要

「目的」
1細胞RNA-seq解析による肝がんの分類に基づいた
新規治療法の開発

肝がん組織
(B型、C型肝炎、NASH)

1細胞RNA-seq

データベース化による統合解析

- 臨床データ
- 治療反応性
- scRNA-seq

臨床研究

基礎研究

「肝がんの新分類」

「肝がんを構成する細胞種の同定」

がんの性質に沿った

構成細胞種ごとに

- 最適な治療の選択
- 既存薬の適応拡大
- 予後予測マーカーの開発
- 新薬治験の加速

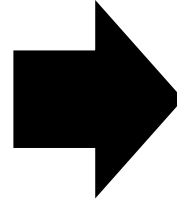
- がん組織内での役割の解明
- 新規治療標的の同定
- 細胞種特異的な薬剤の開発

- 新しい視点に立った肝がんの理解
- 臨床研究と加速
- 基礎研究の基盤形成

検体収集と解析経過

肝組織のシングルセル化とそのRNA-seq

- 同時に8サンプル処理
- 100~10,000細胞/assay
- 最大80,000細胞(10,000x8)/ラン



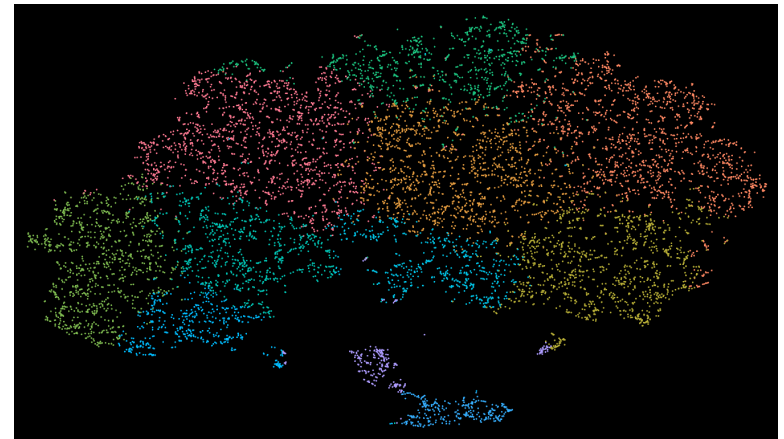
多くの細胞を一度に処理
ヘテロな細胞集団で精度の高い解析

検体収集

- 国立国際医療研究センター
- 東京大学

検体	
疾患	背景因子
HCC	HBV
	HCV
	NBNC

scRNA-seq解析結果 症例A



1点=1細胞(網羅的遺伝子発現データの集約)
9749細胞の結果



- 細胞ごとの遺伝子発現プロファイルを維持
- 臨床情報(予後、治療反応性等)との統合解析

課題番号 : 29指2012
研究課題名 : 1細胞解析を用いた、肝胆膵がんにおける構成細胞の系譜解析とそのデータベース化
主任研究者名 : 溝上雅史
分担研究者名 : 長谷川潔
キーワード : 1細胞解析、肝臓、胆道、膵臓、がん、データベース
研究成果 :

肝胆膵領域のがんは、全がん腫の中でも予後が不良なグループを形成している。その原因として、他のがん種と比べて有効な治療法が少ないこと、肝がんでは再発を繰り返すことが挙げられる。肝胆膵領域のがんの遺伝子レベルの性質は十分に理解されておらず、有効な治療法が少ない一因と考えられる。

本研究は、1細胞解析を用いて、肝胆膵がんを構成する細胞の、1細胞レベルの遺伝子発現や局在をデータベース化することで、予防・診断・治療に応用可能な分子標的や予後予測に影響を及ぼす分子細胞生物学的因子を見出し、患者個々の違いに応じた最適な医療の実現に寄与することを目的としている。

検体としては、研究に同意していただけた方から採取した血液・生検組織・切除標本・病理パラフィンブロックを用いる。これらの検体から、RNA抽出を行ない、scRNA-seqに用いる。また、血清・血漿成分は、上記の網羅的解析から得た遺伝子が、疾患発症や病態進展を反映する分子マーカーとして機能するか検証するために利用する。

当科では、本年度、当院病理部と協力して、肝がんの検体を37例分採取した。また、肝がん生組織から一細胞化する過程の最適化を行った。

課題番号 : 29指2012

研究課題名 : 1細胞解析による肝がん構成細胞の系譜解析を基盤とした新規治療法の開発

主任研究者名 : 溝上 雅史

分担研究者名 : 牛久 哲男

キーワード : 1細胞解析, 肝臓がん, 胆道がん, 膵臓がん, データベース, 病理学的解析

研究成果 :

本研究は、肝がん外科的切除症例の組織片を1細胞単位の全 RNA シークエンスを実施し、網羅的遺伝子発現のデータベースの作成、遺伝子発現パターンを基盤とした肝がん分類と病理形態学的、臨床的特徴との比較による、より臨床的に意義のある分類法の提唱、治療方法の最適化を目的としている。

初年度は、データの基本となる肝がん当院外科切除検体から、数 mm 程度の組織片を的確に採取するプロセスを、当院肝胆膵外科と協力して行った。病理部にて、外科切除検体の生検体の断面の肉眼的観察を行い、がん部、非がん部として最適な検体を採取し、以降、肝胆膵外科の先生方に1細胞解析の検体処理を行って頂いた。2018年12月17日現在で、総計37症例となっている。

該当症例については診断業務としての病理診断が終了した後、詳細な病理学的検討を行い、病理組織学的データベースを作成している。次年度以降、解析データと照らし合わせを行う予定である。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指2012

研究課題名： 1細胞解析による肝がん構成細胞の系譜解析を基盤とした新規治療法の開発

主任研究者名： 溝上雅史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。