

総括研究報告書

研究開発課題名：臨床検体の三次元的複層分子解析によるがん多様性創出機構の実証的解明とその克服に向けた臨床応用研究

研究開発代表者： 加藤 護

目的と概要

治療抵抗性、浸潤・転移などの悪性形質獲得につながる腫瘍内多様性の創出機構を、一細胞シーケンス・複領域のシーケンスによって、数理的解析方法を開発しつつ解明し、そこで得られる知見を交えて血中遊離核酸（cfDNA）研究によって、多様性克服の臨床応用を目指す。

研究開発の成果

1. 一細胞シーケンシングによるがん多様性の数理的解析

腫瘍の発達段階を調査するため、昨年度確立した大腸発がんを模すマウス再生系の発がん過程の3時刻点において、マウスの腫瘍部位から、一細胞を分離し、増幅された DNA および RNA の一細胞シーケンスを実施した。また、腫瘍部位から一細胞を分離しない（Bulk）シーケンスも、クオリティコントロールとして実施した。エキソーム解析では各時点 20-30 細胞、トランスクリプトーム解析では各時点 40-50 細胞のデータ取得に成功した。

これにより得られたデータに、昨年度開発した変異検出パイプラインを適用し、変異・発現量コールを実施した。さらに、クラスター分析や heterozygosity/発現量分散分析などの数理的解析を行うことで、エキソーム解析およびトランスクリプトーム解析にて、細胞間の塩基配列の変異の多様性および発現量の分散を可視化することに成功した。

2. 複領域解析によるゲノム情報の特徴抽出

進行大腸がん 9 例の原発巣を細分割して目的の進行大腸がんのサンプルのみを的確に採

取、DNA を抽出し、メチル化解析を実施した。9 例を分析した結果、発癌の黎明期には重要な癌抑制遺伝子の高メチル化が生じることを明らかにした。一方、癌原発巣の様々な部位における、遺伝子の転写とは無関係な領域の低メチル化により発現する遺伝子群は、おそらく癌遺伝子群の発現が多様性を生じる原因となっており、癌進化の後半であらわれてくる所見と考えられた。

3. cfDNA による多様性検出と臨床応用

血中遊離核酸（cfDNA）からのがん遺伝子異常検出における腫瘍内多様性の影響を調べ、がんの転移や治療抵抗性に関連する遺伝子異常を cfDNA から高精度に検出するプラットフォームを確立することを目指して検討を行なった。

がん患者の剖検症例から検体の収集を行ない、実験開始に十分な 10 症例の検体を蓄積することに成功した。

予備実験として、複数の方法による血漿からの cfDNA 抽出効率の比較検討および cfDNA サンプルからの実験条件検討を行なった。さらに、1 症例について全エクソンシーケンス解析を開始し、今後の本実験開始のための、実験手法の確立に成功した。

今後の方針

以上、1 細胞シーケンス、複領域のシーケンス、cfDNA のシーケンスを用い、DNA・RNA・メチル化から腫瘍内多様性を検出、および解析する方法を開発した。今後はさらに実験・分析を推し進めて腫瘍内多様性をより精緻に解明し、臨床応用につなげる検討を行う。