シングル細胞レベルの Cell Atlas と AI を用いた脳腫瘍治療への展望

夏目 敦至

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科

The State-of-the-Art Treatments for Brain Tumors using Cell Atlas and Artificial Intelligence

Atsushi Natsume, M.D., Ph.D.

Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine

There are approximately 40 trillion cells in a human body. Were the DNA contained in each of these cells to be connected end-to-end, it would measure 74 billion kilometers, amounting to the distance from Earth to Sirius. Analysis of this length of DNA is now possible within a period as short as a few hours. Since the mid-2000s, next-generation sequencing (NGS) has become widely available, and we have now reached the era of the \$1000 genome with which NGS platforms have been completed. Intron-reading whole genome sequencing (WGS) technology is now mainstream, replacing the use of targeted gene sequencing panels. By 2020, we should expect that WGS analysis will become standard over DNA analysis using panel-based NGS or exon sequencing. WGS is now also capable of rapidly screening millions of genetic abnormalities with the advent of artificial intelligence (AI), such as the representative AI, “Watson for Genomics”. In an era with such an abundance of electronic data and overwhelming amounts of published scientific literature, particularly research related to glioma, Watson for Genomics can help scientists more efficiently learn, analyze, and draw conclusions from information contained in 20 million papers on a daily basis, covering topics such as cancerous mutations and the mechanisms of the human body. Information related to genetic mutations can then offer insight into determining the most appropriate therapeutics. Further, the “Human Cell Atlas”, a project aiming to cultivate better understanding of the actions of individual cells in a variety of contexts such as cancer biology, neuroscience, and developmental biology, has now commenced. Within the biological central dogma comprised of the genome, the cell, and the body, medicine will likely evolve rapidly in the coming 2–3 years.

(Received August 30, 2018 ; accepted September 19, 2018)

Key words : glioma, next generation sequencing, single cell analysis, artificial intelligence**Jpn J Neurosurg (Tokyo) 27 : 889–895, 2018**

緒 言

2000年代にヒトゲノム解析が終焉し、あたかもヒトのゲノムすべてが理解できたような錯覚があった。しかし、そこには個体差が多く存在し、各種疾患がゲノム異

常によって引き起こされることが明らかになるにつれ、疾患特有のゲノム異常と進行度に関連した異常の蓄積、さらにそれらを標的とした分子標的治療が開発されている。

連絡先：夏目敦至，〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科

Address reprint requests to: Atsushi Natsume, M.D., Ph.D., Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8550, Japan

1,000 ドルゲノム時代の到来

従来は塩基配列はサンガー法が用いられてきた。サンガー法は、デオキシリボ核酸を用いて DNA ポリメラーゼの伸長を止める chain terminator 法である。一方、次世代シーケンスは機種ごとに原理が異なっている。大きく分けて、合成シーケンス法、パイロシーケンス法、リガーゼ反応シーケンシング法が用いられる。これらの方法によって塩基配列決定速度が飛躍的に高まった。2003 年でのヒトゲノム計画で、ヒトのゲノムをすべて解読したと大きな話題になったが、当時は従来方法により 13 年の歳月と 3 千億円の費用がかかった。2007 年に次世代シーケンス法を用いて初のヒトのゲノムが解読されたが、そのときはたった 2 カ月、1 億 2 千万円程度で読み切った。その後、次世代シーケンサーの技術の向上とともに費用も安価になりつつあり、今後はヒト 1 人のゲノム解読は 1 時間、数万円 (1,000 ドル) でできるようになるといわれている。

癌ゲノム解析

次世代シーケンサーの登場により塩基配列決定能力が革新的に上がり、癌研究に応用されている。多くの癌は体細胞ゲノムの塩基配列の変化 (変異) や染色体の増減が原因である。中には遺伝性腫瘍があり全身の細胞が変異している場合もあるが、ほとんどは癌細胞だけの遺伝子変化に留まっている。

しかし、同じ癌種でも遺伝子変化が起こっている部分が個人によって異なることが明らかになり、それを多くの患者で検討すると数個のタイプに大別されることが明らかになってきた。したがって、同じ癌種でも、原因となる遺伝子は異なり、治療効果のある抗癌剤も異なることになる。この次世代シーケンサーを用いた研究により、癌の悪性度、治療反応性、予後などの指標となる遺伝子変化が明らかになりつつある。この指標 (バイオマーカー) が得られれば、副作用が強く治療効果が期待できない抗癌剤を避け、より最適な抗癌剤が個別に採用されることになる。

まず次世代シーケンスで、癌の原因遺伝子を見出す方法は、エクソン (ゲノム上で最終的に成熟 mRNA となる部分) 部分のみを取り出してシーケンスすることでコストを 1/10 にできる。これによってタンパク質構造が変化するような変異を見出すことができる。

このように腫瘍の進展形式が明らかになり、治療抵抗性や悪性化のメカニズムが解明され治療の発展につながる

ると考えられる。

エクソンシーケンス

エクソンシーケンスにおけるターゲット領域の濃縮方法を Fig. 1 に示す。これはアジレント社の SureSelect の例であるが、アジレントは RNA ベイトを使用している。エクソン領域の配列に合わせた RNA ベイトはビオチン化されており、ハイブリダイゼーションによりエクソン領域のみを回収する (Fig. 1)。

次世代シーケンサーのデータ量は膨大であるため解析にはスーパーコンピュータが必要である。リード長が 75~200 bp のため、ヒトゲノムのリファレンス配列を使用し、各リードを貼りつけていく作業を行う。そのためには高速度の処理を並列化して処理することのできる機能が必要でありスーパーコンピュータが必須となっている。東京大学情報基盤センターのハードディスクは 4.6 ペタバイト、計算能力は 225 テラフロップス、ジョブ処理数は年間あたり 2,340 万ジョブであるが、昨今のニーズ増大により、許容量を越えそうである。

変異を同定する手法はいくつか公開されている。そのうちのひとつである EBCall は東京大学医科学研究所で開発された。この手法はシーケンサーによるエラーを効率よく排除するために、複数の正常検体のシーケンスデータを使用するのが特徴である。シーケンスの精度は、Depth と Coverage という用語を使う。Depth は 1 カ所の領域に結合する総リード数の平均で、エキソームであれば 100~150 くらいで読むことが多い。Depth が高ければ低アレル頻度の変異を同定できる。

Coverage は標的とした領域の何%をカバーできたかを示す。コスト削減のために、いくつかのサンプルを pool することが多い。ハイブリダイゼーションの前に pool する pre-pool、ハイブリダイゼーションの後に pool する post-pool がある。Pre-pool のほうが先にサンプルを混ぜるため、以後の手技が楽になりコストも安いことになる。

しかし、post-pool のほうがデータの質は高い。一方、pre-pool ではハイブリダイゼーションに持ち込む 1 サンプルあたりの DNA 量が pool 数に応じて減少するため DNA の多様性が減少する。つまりいくら深くシーケンスしても同じ DNA 断片を読むことになり duplicate が増えてしまうことが欠点である。

Fig. 1 Target enrichment methodology

Target enrichment methodology in exon sequencing is shown in Fig. 1, depicting an example of the Agilent SureSelect model using a RNA bait. RNA bait corresponding to the exonic regions are biotinylated, and hybridization to these regions is leveraged to specifically analyze exonic regions.

次世代シーケンサーとスーパーコンピュータによる脳腫瘍の遺伝子異常の解明

同じ臓器の癌でも患者が異なればその遺伝子異常は異なるということはさまざまな腫瘍で明らかとなっている。そのため、遺伝子異常を解明するには多数の症例が必要となる。日本国内5施設から合計332例の低悪性度神経膠腫のDNAを採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行った。これらのデータに加え、米国のThe Cancer Genome Atlasが公開している425例のシーケンスデータも利用した。

2015年、Suzukiら¹⁰⁾は低悪性度グリオーマから二次性グリオブラストーマを形成する過程において、IDH1遺伝子異常が最も早く起こるイベントであることを明らかにした。多くの低悪性度グリオーマはまずIDH1遺伝子異常を獲得した後に、他の遺伝子異常を獲得してアストロサイトーマ、オリゴデンドログリオーマとなっていく。IDH1変異と1p19q lossを示すType 1(オリゴデンドログリオーマ)は、IDH1変異とTP53遺伝子異常を獲得

したType 2(アストロサイトーマ)と比較して有意に予後がよいことが明らかになった(Fig. 2)。大変興味深いことに従来のWHOグレード2, 3のグリオーマをまとめて、1p/19q共欠失の有無で分類することにより、WHOグレード(グレード2, 3)よりも正確に予後を予測することができた。低悪性度グリオーマ(グレード2)と退形成性グリオーマ(グレード3)をまとめてlower grade gliomaとし、遺伝子異常により正確に悪性度診断をすることができることが明らかになった。興味深いことにIDH1変異を有さないType 3は原発性グリオブラストーマに近い遺伝子異常パターンを示し、予後も比較的原発性グリオブラストーマに近いことが明らかになった。今後はIDH1変異に依存しない、Type 3 lower grade gliomaの腫瘍形成メカニズムの解析が待たれる。

癌エピゲノム解析

癌ゲノム解析が進み、エピゲノムを調節する遺伝子に多数の不活化の変異を認めることがわかってきた。この

Fig. 2 Three genotypes in lower-grade gliomas

A large proportion of benign gliomas must first acquire genetic aberrations in the IDH1 gene before acquiring other genetic aberrations to transform into astrocytoma and oligodendrogloma. Mutation of the IDH1 gene and 1p19q loss marks Type 1 gliomas (oligodendroglomas), which have better prognosis in comparison to Type 2 gliomas (astrocytomas), characterized by IDH1 mutation and TP53 genetic aberrations.

変異によってエピゲノム（DNA メチル化、ヒストン修飾や非翻訳 RNA の発現）に変化が生じ、それが遺伝子の異常な発現につながっている¹⁾。つまりゲノムとエピゲノムの変化は独立した事象ではなく、互に関連しクロストークしていると考えられる。このエピゲノムの異常は非可逆的なゲノム異常とは異なり可逆的であるため近年、治療のターゲットとしても注目され、急速に解析が進んでいる（Fig. 3）。

① DNA メチル化解析

癌の特徴的なエピゲノム異常のひとつに DNA のメチル化による転写制御の異常がある。実際に、グリオーマにおいては、若年で比較的前後がよいといった特徴をもつ DNA の異常な高メチル化を示す群が存在する⁷⁾。また MGMT 遺伝子の DNA メチル化はグリオーマ抗癌剤の効果予測因子とされ、実臨床にて必須の検査項目となっている⁴⁾。

DNA のメチル化を解析するためには、まずメチル化 DNA を検出する必要がある。これには、①バイサルファイト法（バイサルファイト処理によりメチル化されていないシトシンはウラシルに変わり、メチル化されたシトシンはそのまま残る。つまりメチル化の有無によって異なった塩基配列になることを利用する）、②制限酵素法（メチル化された塩基の種類および位置によって DNA を切断できなくなる制限酵素の特徴を利用する）、③メチル化親和性タンパク質による DNA 濃縮（断片化した DNA とメチル化 DNA 親和性タンパク質を結合させメチル化 DNA のみ濃縮する方法）がよく用いられる。

ゲノム DNA の目的領域が決まっている場合は①、②の方法、網羅的な解析を行う場合には③の方法が用いられることが多い。次に、①～③で収集した DNA を研究の目的に応じて解析する。特定の遺伝子領域の DNA メチル化を定量するためにはリアルタイム PCR（methylation-specific PCR）やシーケンサー（パイロシーケンス

Fig. 3 Epigenome regulation

Genes controlling the epigenome show large amount of inactivating mutations. These mutations cause changes in the epigenome (i. e. DNA methylation, histone modification, and expression of non-coding RNA) and are linked to the aberrant expression of specific genes.

法)を用いて解析する。またゲノムワイドに網羅的な解析を行う場合にはマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて解析する。網羅性、定量性、経済性、簡便性を考えて適切な方法を選ぶ必要がある。

② ChIP on Chip と ChIP-seq

DNA はヒストンというタンパク質に巻き付いて核内に存在する。このヒストンへの化学修飾（メチル化、アセチル化など）もエピゲノムのひとつで、この異常によってヌクレオソームの構造が変化し、遺伝子の転写調節異常が起こる¹⁾。実際に、グリオーマにおいては、ヒストンをコードする遺伝子異常（H3F3A）を生じる一群が存在し、それらは幼児期や青年期に正中部に発生する特徴をもつ⁹⁾。

異常な化学修飾を受けているヒストンが巻きついている DNA の領域を網羅的に調べる方法が ChIP on Chip または ChIP-seq である。“ChIP”はクロマチン免疫沈降法（chromatin immunoprecipitation）の略、“chip”はマイクロアレイを指し、“seq”は次世代シーケンスを指す。つまりヒストン修飾酵素で免疫沈降した DNA を ChIP on Chip ではマイクロアレイで、ChIP-seq では次世代シーケンサーで解析する手法である。具体的には、DNA 結合タンパク質と DNA を架橋結合した後に、クロマチンを断片化し、目的とするヒストン修飾酵素に対する特異的な抗体による免疫沈降を行う。その後、架橋結合を解除し、DNA を回収する。ChIP on Chip では回収した DNA を必要量まで PCR で増幅し、蛍光標識試薬で標識の後、マイクロアレイにハイブリダイゼーションする。また

ChIP-seq ではさらに断片化した後に両末端にアダプターを付加し PCR で増幅し、シーケンスする。ChIP-seq は ChIP on Chip に比べて短い配列を取得するため感度や解像度が優れ、さらに少量のサンプルで解析できることがメリットとされている。

③ RNA シークエンシング（RNA-Seq）

ヒトゲノムの 80% 以上は RNA に転写されるが、その中でタンパク質に翻訳されるものは 2% 以下であり大多数は翻訳されない RNA（non-coding RNA：ncRNA）である³⁾。18～24 塩基からなるマイクロ RNA と 200 塩基以上からなる長鎖非翻訳 RNA などの ncRNA はエピゲノム調節や他の RNA との相互作用などの生物学的活性を介して癌に関連することがわかってきた⁶⁾。実際に、microRNA-211¹¹⁾や TUG1⁵⁾、ECONEXIN²⁾といった ncRNA がグリオーマ形成や増殖に関わると報告されている。

これら ncRNA の機能を解析するためにはその発現量を計測する必要がある。かつては特定の RNA 発現量の測定にマイクログラム単位の RNA を使用したノーザンブロット法が行われた。その後、PCR が普及するに伴ってナノグラム単位の RNA を使用したリアルタイム PCR 法が開発され、現在でも広く用いられている。時代は進み、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンシングが登場しゲノムワイドな RNA の発現解析が可能な時代となった。RNA シークエンシングでは 1 ng の total RNA があれば解析を行うことが可能になった。TCGA プロジェクトの後の Human Cell Atlas プロジェクトでは、

1細胞でのイメージングおよびRNA-Seqが行われるようになって⁸⁾。

今後の方向性

上記のような技術革新を受けて、臨床の現場でもゲノム解析を行い、適切な個別化医療を模索するプロジェクト（がんゲノム医療中核拠点）が立ち上がった。現在のところ、全エクソシーケンス、もしくは100個以下のミュータチオン変異を調べるターゲットパネルが行われている。しかし、上記のように非翻訳RNAの解析やプロモーター領域の変異解析を行うには不十分であり、全ゲノム解析に数年以内に移行していくと考えられる。ある患者で検出される変異は約1,500遺伝子あり、そのうち遺伝的個性・多様性（SNP）は1,400遺伝子、したがって有用な遺伝子は数10個程度である。近年加速度的に増加する研究論文、臨床試験の論文の中から、エビデンスレベルの高い情報を抽出する作業がとてつもなくボトルネックとなっている。そのため、IBM Watson for Genomicsのような人工知能の活用が必須となってくる。このようなサービスを提供する企業も増えてきていて、アカデミアと中核拠点と企業が共同して進めていく必要がある。

COI

著者は日本脳神経外科学会へのCOI自己申告の登録を完了しています。本論文に関して開示すべきCOIはありません。

文 献

- 1) Dawson MA, Kouzarides T: Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**: 12-27, 2012.
- 2) Deguchi S, Katsushima K, Hatanaka A, Shinjo K, Ohka F, Wakabayashi T, Zong H, Natsume A, Kondo Y: Oncogenic effects of evolutionarily conserved noncoding RNA ECON-EXIN on gliomagenesis. *Oncogene* **36**: 4629-4640, 2017.
- 3) Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Dutttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo QJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras TR: Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108, 2012.
- 4) Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R: MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003, 2005.
- 5) Katsushima K, Natsume A, Ohka F, Shinjo K, Hatanaka A, Ichimura N, Sato S, Takahashi S, Kimura H, Totoki Y, Shibata T, Naito M, Kim HJ, Miyata K, Kataoka K, Kondo Y: Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment. *Nat Commun* **7**: 1616, 2016.
- 6) Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, Xiong Y: Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 (INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* **30**: 1956-1962, 2010.
- 7) Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liao LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS: Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol* **29**: 4482-4490, 2011.
- 8) Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE: Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* **344**: 1396-1401, 2014.
- 9) Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, Hovestadt V, Albrecht S, Kool M, Nantel A, Konermann C, Lindroth A, Jäger N, Rausch T, Ryzhova M, Korbel JO, Hiescher T, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Ebinger M, Schuhmann MU, Scheurlen W, Pekrun A, Frühwald MC, Roggendorf W, Kramm C, Dürken M, Atkinson J, Lepage P, Montpetit A, Zakrzewska M, Zakrzewski K, Liberski PP, Dong Z, Siegel P, Kulozik AE, Zapatka M, Guha A, Malkin D, Felsberg J, Reifemberger G, von Deimling A, Ichimura K, Collins VP, Witt H, Milde T, Witt O, Zhang C, Castelo-Branco P, Lichter P, Faury D, Tabori U, Plass C, Majewski J, Pfister SM, Jabado N: Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**: 226-231, 2012.
- 10) Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S: Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* **47**: 458-468, 2015.
- 11) Zhang J, Lv J, Zhang F, Che H, Liao Q, Huang W, Li S, Li Y: MicroRNA-211 expression is down-regulated and associated with poor prognosis in human glioma. *J Neurooncol* **133**: 553-559, 2017.

要 旨

シングル細胞レベルの Cell Atlas と AI を用いた脳腫瘍治療への展望

夏目 敦至

ヒトの細胞は約 40 兆個あり、細胞の DNA をつなげると 740 億 km ある。地球からシリウスまでの距離に相当する。この長さの DNA をわずか数時間で解析できる時代になった。2000 年代半ばから「次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing : NGS)」が普及し、1,000 ドルゲノムの時代を迎え、プラットフォームが完成した。今はイントロンまでを読み込む全ゲノム解析 (WGS) が主流となり、パネル解析は間もなく終焉を迎える。2020 年にはパネルでもエクソンでもなく、WGS で解析するのが通常という時代が到来する。加えて人工知能 (AI) の登場である。

WGS では数千～数百万の遺伝子異常が見つかる。代表的な AI は Watson for Genomics である。電子化知識は氾濫し、グリオーマ関連の論文をキャッチアップするだけでも膨大な時間がかかる。Watson は 2,000 万報を超える論文情報をはじめ、癌の変異や生命のメカニズムに関する膨大な知識を日々学び理解し推論する。遺伝子変異情報を元に適切な薬剤の情報を与える。さらに Human Cell Atlas の開始である。癌、ニューロサイエンス、発生などの分野でひとつひとつの細胞の挙動を明らかにしていくというプロジェクトである。ゲノム・細胞・そして個体というドグマの中で、医療はわずか 2～3 年で激変しているだろう。

脳外誌 27 : 889-895, 2018