

令和3年度

がん・心臓病の基礎的・先駆的  
研究事業報告書

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団

はじめに

我が国において、死因の上位を占める疾患の基礎的研究の促進を図り、学術の向上と国民の健康増進に寄与することを目的として、当財団では昭和62年から助成事業の枠に新たに「がん・心臓病の基礎的研究事業」を設定し、更に平成13年度からは「がん・心臓病の先駆的研究事業」も対象に加え、「医療の基礎的、先駆的研究助成事業」として令和3年までの527件のプロジェクトに対し、約4,038百万円の助成を行なってまいりました。

がんの早期発見、心臓病の予防等は現代人の国民生活にとって大変関心の高いものであります。

がん研究を見ると、がん本体の解明とその診断及び治療法の開発等がん制圧のための研究が鋭意進められており、その研究成果も上がり、がんは治る病気といった感を抱かせます。

また心臓病についても分子生物学的領域にまで研究が進んでおり動脈硬化や心臓病の治療に遺伝子を用いる手法等も行なわれるようになりました。

これらの研究事業を実施された研究者の方々は、3年間以内という限られた期間のうちに少人数で研究を行い、これを取りまとめることは非常なご苦勞があったと思います。今回の研究成果は、今までにそれぞれの学会或いは論文により発表されて、それぞれに高い評価を受けておられます。

この研究成果について、より広く社会の各方面に公表することが必要との声もあり、この要請に応え、令和3年度をもって研究が終了し、私どもに提出していただいた研究報告書を抄録としてここに刊行する次第です。がん・心臓病の今後の研究に少しでも役立てば幸いです。

令和4年12月

公益財団法人車両競技公益資金記念財団  
理 事 長 田 宮 治 雄



## 目 次

膵がんの微小転移を制御するエピゲノム変化の in vivo 評価系の確立	1
.....岡田 斉.....	
ncRNA が関わる乳がんホルモン療法抵抗性獲得の個体レベルでの解析	13
.....斉藤 典子.....	
がん細胞上分子会合体を標的とした新規抗体医薬創薬システムの構築	23
.....小谷 典弘.....	
多次元テンソル情報から臨床予後の精緻な予測を可能とする革新的人工知能の開発研究	35
.....後藤 信哉.....	



膵癌の微小転移を制御するエピゲノム変化の in vivo 評価系の確立



### <研究の概要>

膵がんは、世界的に最も悪性度の高いがんの一つであり、進行癌の5年生存率は10%に満たない。また、2030年にはがん死亡原因の第2位になると予測されている。従って、膵がんの新たな予防・治療戦略の策定は喫緊の課題である。予後不要である原因は、早期発見の困難さ、根治手術の困難さ、薬剤耐性獲得など複数の要因が存在する。また、膵癌の微小転移・浸潤が重要な予後規定因子であることが強く示唆されているが、微小転移を含む転移病変の腫瘍動態、生物学的特性、エピゲノム変化の詳細を、ヒト検体のみを用いて明らかにすることは技術的な困難を伴う。そこで、本研究では、マウス膵がんモデルから樹立したオルガノイド、オルガノイドの同所移植マウスモデルおよびヒト膵癌細胞株の解析とゲノム編集技術を用いた網羅的スクリーニングとを組み合わせ、膵がん発症、局所浸潤、転移、治療抵抗性獲得に関与する遺伝子変異間の協調関係と、それらがもたらす遺伝子発現、およびエピゲノムへの影響を明らかにする。更に、オルガノイドモデルから得られたデータを、ヒト膵がんのエピゲノムデータと比較し、多角的な解析を行う。

近年のヒト臨床検体を用いた遺伝子発現、変異解析により、膵がんで高頻度に変異を示す遺伝子群が同定されている (Nature, 2016)。しかしながら、膵癌を特徴付けることが予想されるこれらの遺伝子変異が膵がんの発症、進展を制御する機序については十分解明されていない。ヒト膵がんの95%以上で検出される KRAS 遺伝子の変異に加え、前がん病変である膵上皮内腫瘍 (PanIN) の悪性化には付加的な遺伝子変異の蓄積が必要と考えられている。また近年、特に転移においては、遺伝子変異よりもむしろエピゲノム変化が中心的な役割を担うとも報告されており (Nature Genet. 2017)、初期イベントである KRAS 変異が付加的遺伝子変異及び、エピゲノム変化と協調的に機能して膵がんの病態を促進させるというモデルが明らかになりつつある。

微小転移の形成に重要と考えられる、がん細胞の環境適応に関わる遺伝子の発現、エピゲノム変化の継時的解析は、ヒト臨床検体を用いた解析では実現困難である。オルガノイドは、プライマリのがん病変の生物学的特性を維持したまま、付加的な変異を導入することなく継代と保存が可能である。本研究では主として gRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニング及び網羅的遺伝子発現解析から得られた結果を基に、ヒト膵癌細胞株、オルガノイドを用いた機能的検証、ヒト膵がんデータベースを用いた臨床的特性、予後との関連の解析へと展開し、膵がんおよび他の癌腫に対する新規治療標的探索、悪性化の防止といった医学分野への応用に繋げる実験系を確立することを意図して研究を行った。

本研究により膵癌の発症進展及び微小環境構築にはエピゲノム因子が、代謝リプログラミング、免疫微小環境構築等に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。また、癌種を超えて機能するエピゲノム因子の一端が明らかとなったことから、エピゲノム制御因子を標的とした治療法の開発に結びつくことが期待される。



## 共同研究者の氏名・所属機関

河津正人 千葉県がんセンターがん治療開発グループ細胞治療開発研究部・部長

金井昭教 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

上田 健 近畿大学医学部生化学教室・准教授

古室暁義 近畿大学医学部生化学教室・講師

## 研究報告

### I 研究目的

膵がんは、世界的に最も悪性度の高いがんの一つであり、患者予後は著しく不良である。また、年齢調整死亡率は近年増加傾向にある。ヒト臨床検体を用いた変異解析により、膵がんで高頻度に変異を示す遺伝子群が同定されている。しかしながら、これらの遺伝子変異が膵がんの発症、進展、治療反応性を制御する機序については十分解明されていない。また、薬剤耐性獲得細胞の出現も治療上の課題となっており、新規治療標的の同定、新規治療薬の開発が急がれている。癌微小転移・浸潤が膵がんの重要な予後規定因子であることも報告されているが、微小転移・浸潤を含む転移病変の腫瘍動態、生物学的特性、エピゲノム変化の詳細は明らかではない。近年、特に膵癌の転移においては、エピゲノム変化が中心的な役割を担うとも報告も為されており、遺伝子変異及び、エピゲノム変化とが協調的に機能して膵癌の進行に寄与するというモデルが明らかとなりつつある。

そこで、本研究では、これらの機序の詳細を明らかにする目的で異なる遺伝子変異を有するマウス膵がんモデルから膵癌オルガノイドを樹立し、オルガノイドの同所移植マウスモデルおよびヒト膵癌細胞株の解析とゲノム編集技術とを組み合わせ、膵癌の発症、局所浸潤、転移、治療抵抗性の獲得に関与する遺伝子間の協調関係と表現系の変化を明らかにする。その際、これまでの予備データから、エピゲノム因子が表現系獲得に果たす役割に着目して解析を進め、これらのモデルから得られた解析データを、ヒト膵がんの解析データと比較検討する。また、他の癌種の解析データとの比較も行い、新規治療標的の同定、新規治療法の開発につながる基盤研究を行う。

### II 研究計画及び材料と方法

本研究では、マウス膵オルガノイドにゲノム編集を適用し、Kras 変異と協調して膵がんの病態制御に機能する遺伝子群を同定する。更に、これら遺伝子群が膵がんの転移に及ぼす影響と、遺伝子発現およびエピゲノム変化との関連を明らかにする。

研究ツールとしては、i) ヒト膵がんのドライバー変異である Kras<sup>G12D</sup> を有する変異マウスと、ii) ヒト膵癌で認められる Trp53<sup>R172H</sup> 変異マウスとを交配して作製した Kras<sup>G12D</sup> と Trp53<sup>R172H</sup> 変異の複合変異マウス (Kras/Trp53) 及び Kras<sup>G12D</sup> と Utx<sup>flox/flox</sup> 変異の複合変異マウス (Kras/Utx) を用いる。(図 1)。

#### 1) マウス膵オルガノイド の作成とその解析

Kras/Trp53、Kras/Utx マウスを用いてマウス膵オルガノイドを樹立し、この過程でオルガノイドの抗体染色、遺伝子導入技術と同所移植モデルを確立する。更に、オルガノイドの形態、オルガノイドの細胞増殖（腫瘍サイズ）、浸潤能（転移との関連）、同所移植などの病態解析を行うとともに、評価系を構築する。

## 2) guide RNA レンチウイルスベクターの作成と導入

ヒト膵がんにおいて高頻度で変異が認められる約 30 種類の遺伝子を選択し (Nature 2016, Cancer Cell 2017)、各遺伝子に対応する guide RNA (gRNA) とコントロール gRNA をバーコード配列を持つベクターに組み込み、レンチウイルスの手法を用いて、Kras/Trp53 マウス由来の膵オルガノイドに導入し、各遺伝子に対する gRNA によるゲノム編集の効果を評価する。

## 3) マウス膵オルガノイドを用いた病態促進に機能する遺伝子群の包括的同定

ウイルス力価が均等になるように調製した各遺伝子に対する gRNA のプールを Kras/Trp53、Kras 膵オルガノイドに導入後、これらをマウス膵臓に移植する。初期病巣と長期観察により得られた肝臓への転移巣からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーにより、各 gRNA に対応するバーコード配列の出現頻度を解析して、Kras/Trp53、Kras と協調して腫瘍に促進的に機能するがん抑制遺伝子の種類と、その寄与度を初期病巣と転移巣のそれぞれで明らかにする。

## 4) 遺伝子発現およびクロマチン構造における分子基盤の解析

gRNA のプールを導入したオルガノイドを同所移植されたマウスの初期病変と転移巣から RNA シーケンスを行う。得られた遺伝子発現情報を初期病変と転移病変間で比較し、それぞれの過程で共通して機能する遺伝子群、特異的に機能する遺伝子群を抽出し、特定の機能を有する遺伝子群の発現が各々の過程でどのように変化したかを、パスウェイ解析により明らかにする。エピゲノム状態の変化を包括的に解析する目的で、初期病変と転移巣、各々の病期におけるオープンクロマチン領域の特性を調べ、病態促進に寄与するクロマチン構造の特徴を明らかにする。

## 5) ヒト膵がん細胞株を用いた解析と他の癌種への応用

マウス膵オルガノイドで同定されたがん抑制遺伝子の組み合わせの影響を、ヒト膵がん解析データを用いた機能的検証、データベースを用いた臨床的特性、予後との関連の解析へと展開し、膵がんの新規治療標的探索、悪性化防止、治療抵抗性獲得機序の解明に繋げる。更に、膵癌の発症・進展、治療薬反応性に影響を与えるエピゲノム制御因子の機能を他の癌腫を用いて検証する。

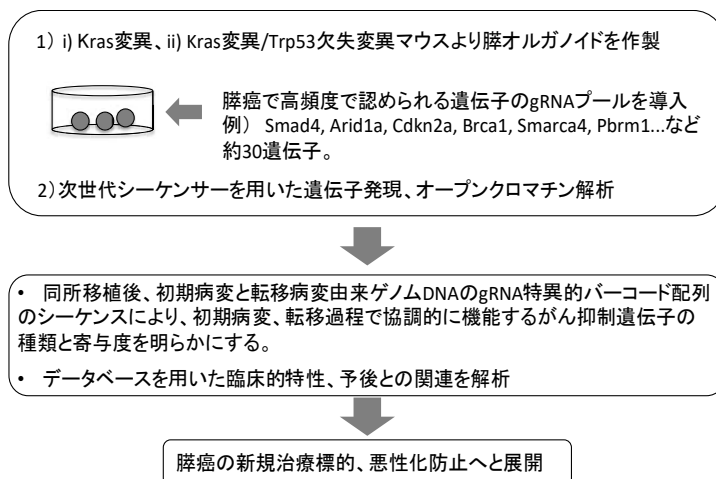


図1. 本研究方法の概略

### Ⅲ 研究成果

KRAS と TP53 の変異はヒト膵癌の発症に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、先ず、Pdx1-Cre ; Kras<sup>G12D</sup> (Kras)、 Pdx1-Cre ; Kras<sup>G12D</sup> ; Tp53<sup>R172H</sup> (Kras/Tp53)、Pdx1-Cre ; Kras<sup>G12D</sup> ; Utx<sup>flox/flox</sup> (Kras/Utx) 変異マウスを樹立し、それぞれの変異マウスにおける膵癌発症を解析した。Kras/Utx マウスで発症する膵癌は多房性の嚢胞を形成しすることが形態的な特徴的であった。また、上皮間葉転換 (EMT) マーカーである  $\alpha$  SMA、サイトケラチンの強い発言を認めた。これらの組織学的特徴は、Utx 欠損が膵癌の EMT を強く誘導する可能性を強く示唆している (図 2)。更に、遺伝子変異による表現系の差異を明らかにする目的で、野生型、Kras、Kras/Tp53、Kras/Utx マウス膵臓および膵癌から、それぞれ独立した 3 ラインのオルガノイドを樹立し、網羅的遺伝子発現解析を行った (図 3)。

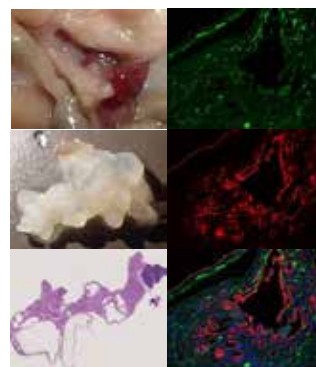


図2. Utx欠損により誘導された膵癌

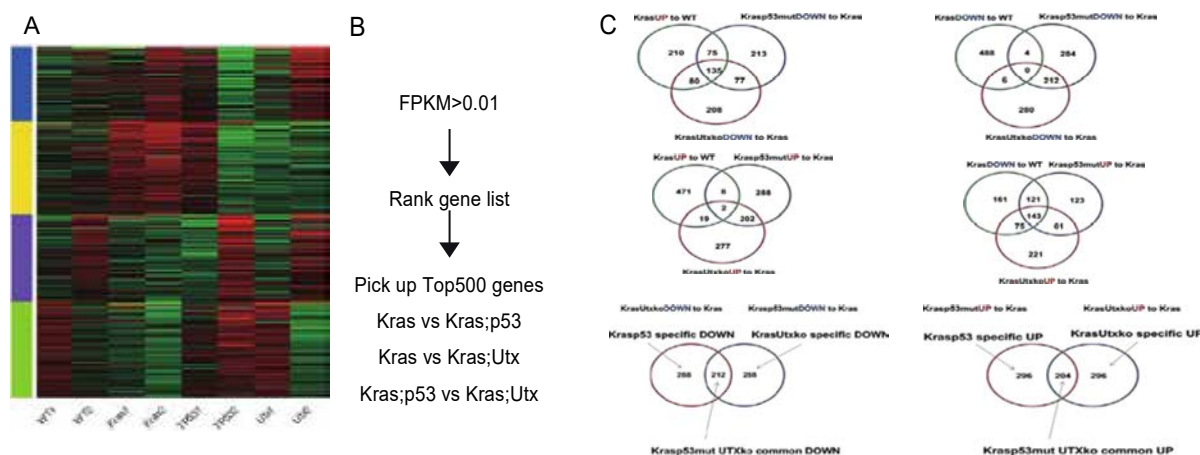


図 3 野生型、Kras、Kras;p53、Kras;Utx 変異を有する膵癌の遺伝子発現解析

先ず、Kras オルガノイドと Kras/Tp53 オルガノイド、Kras オルガノイドと Kras/Utx オルガノイドで発現量が上昇した遺伝子を比較すると、Tp53<sup>R172H</sup> オルガノイドでは細胞分裂、DNA 複製に関するパスウェイが上位を占めていた。また、Utx オルガノイドでは比較的機能的に広範囲なパスウェイがヒットし、細胞接着や細胞応答、代謝に関連したパスウェイであった (図 4A)。次に低下している遺伝子群に着目した。cilia motility、movement に関しては 3 群とも類似性が認められた (図 4B)。

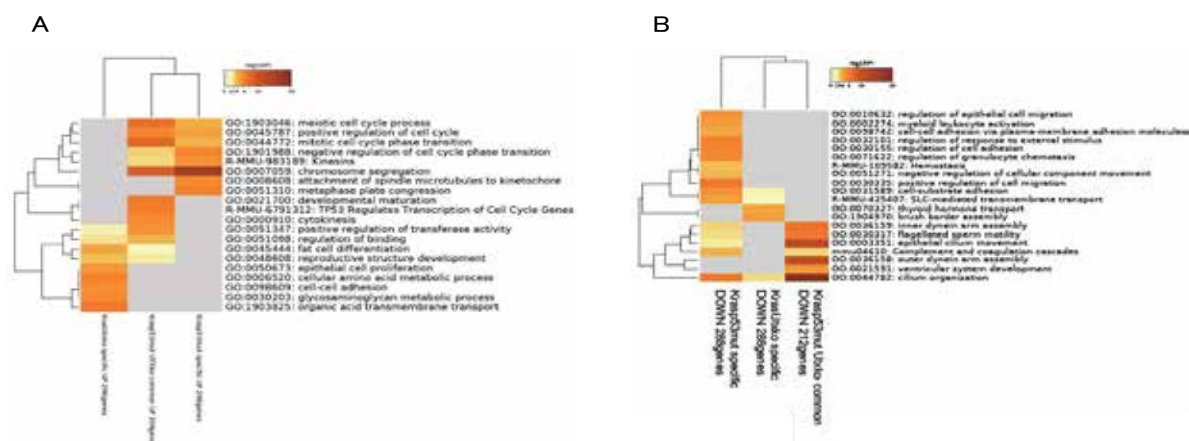


図 4 遺伝子変異特異的に発現上昇 (A) あるいは低下する遺伝子のパスウェイ解析

Gene Enrichment Analysis (GSEA)を用いた網羅的遺伝子発現シグネチャー解析を行なったところ、Ras オルガノイドでは Ras、 $\text{IFN}\gamma$  の遺伝子発現シグネチャーが enrich していた (図 5)。また、Ras/Utx オルガノイドは EMT、血管新生および炎症性サイトカイン遺伝子発現シグネチャーが enrich していた。また、並行して行っていた個体レベルでの Utx の機能解析から Utx が特異的な脂質代謝経路を活性化することを見出した (Scientific Reports., 2019)。

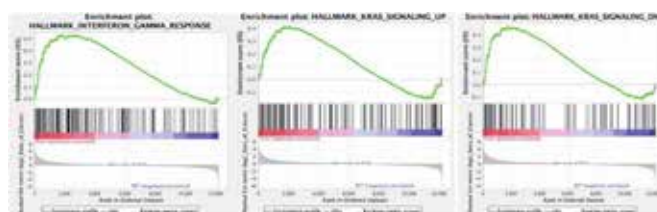


図 5 野生型オルガノイドと Kras オルガノイドの GSEA 解析

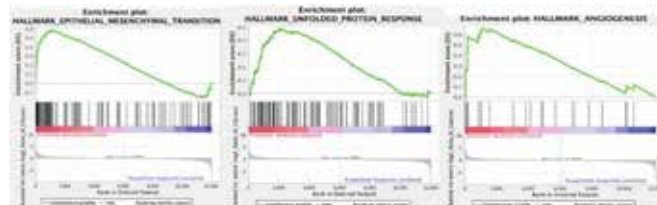


図 6 Kras/Trp53 オルガノイドと Kras/Utx オルガノイドの GSEA 解析

この代謝経路のリプログラミングは Ras 経路を活性化する可能性が高く、エピジェネティクス制御因子の重要性を示している。

上記結果から、Tp53、Utx 変異により程度の違いはあるものの EMT、炎症性サイトカインのシグナルの増強が共通の遺伝子発現シグネチャーとして抽出された。現在同所移植、転移モデルにおける検証と治療標的の探索を行なっている。また、得られた炎症性サイトカインの中から Ras 変異により誘導される  $\text{IFN}\gamma$  シグナルを抽出し、特に膵癌免疫微小環境に影響を与える遺伝子を gRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定を試みた。gRNA ライブラリーを導入した細胞を  $\text{IFN}\gamma$  処理し、細胞表面に発現する CD274 がコントロール細胞よりもより強く誘導される、あるいは減弱する細胞をセルソーターにて分離した (図 7)。次に分離した細胞において CD274 発現がコントロール細胞よりもより強く誘導される、あるいは減弱する細胞で濃縮されている遺伝子を同定した。その結果、CD274 の発現を増幅する遺伝子として IRF2、SOCS1、発現を抑制する gRNA として IFNGR1、JAK1、2、STAT1、2、CD274 といった  $\text{IFN}\gamma$  シグナル制御に関与することが報告されている遺伝子、CD274、及び新規遺伝子に対する gRNA が得られた (カットオフ値、 $\log_2\text{FC} > 2$ 、 $P\text{-value} (-\log_{10}) > 2$ )。スクリーニングで得られた個別の遺伝子に対する gRNA とコントロール gRNA をマウス膵癌オルガノイドおよびヒトがん細胞株に導入し、解析を行なったところ、スクリーニング結果が再現された。スクリーニングで得られた遺伝子の現在までの解析により、これらは①  $\text{IFN}\gamma$  シグナルの増強・抑制、② 糖鎖修飾による PD-L1 と抗 PD-L1 抗体との親和性の制御、③ PD-L1 の安定性の制御、④ PD-L1 の転写制御、⑤ タンパク質の膜輸送の制御に関わる遺伝子に分類されることが示唆された (未発表データ)。

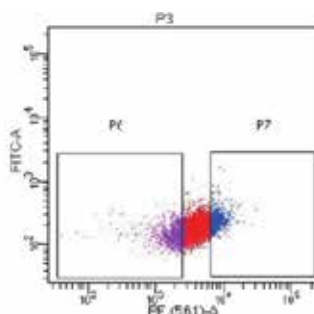


図 7. CD274 の発現による細胞のソーティング

本研究で樹立したオルガノイドの同所移植・転移モデル、コンジェニックマウス細胞株を用いた検証を行っている (論文投稿準備中)。

Ras 変異膵オルガノイドでスクレオチド合成経路の活性化を認めた。そこで、ヒト膵癌細胞株を用いた gRNA ライブラリーを用いてゲムシタビンに対

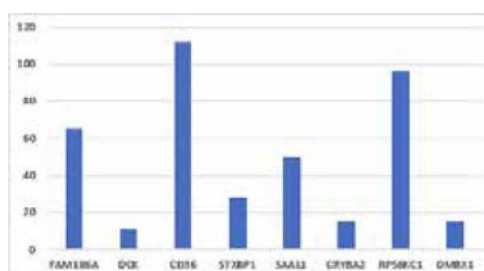


図 8 Gemcitabine 耐性がん細胞における変異遺伝子と変異数

する反応性を制御する遺伝子のスクリーニングを行った。スクリーニングで得られた候補遺伝子を詳細に解析したところ、ゲムシタビン抵抗性癌細胞に enrich している遺伝子変異（図 8：公開データベースを独自に解析）を認め、これらには Akt/PI3K 及び脂質代謝に関わる機能を有する遺伝子が含まれていた。スクリーニングで得られた候補遺伝子に対する個別の gRNA を用いた確認実験でスクリーニング結果を確認後、網羅的遺伝子発現解析、公開データから抽出したヒト膀胱がん予後、生化学的解析、臨床データを加えた解析を行った（論文投稿準備中）。

今後、本研究により樹立した実験系・解析系にシングルセル解析系を加味し、癌微小環境の構築、転移、治療反応性を制御するエピゲノム因子の詳細な解析を行う予定としている。

#### IV 考察

膀胱がんは、世界的に最も悪性度の高いがんの一つである。本研究では膀胱がんオルガノイド、細胞株、ヒト臨床データを用いて、癌微小環境の構築、代謝リプログラミング、治療抵抗性獲得に関与する遺伝子変異間の協調関係と、それらがもたらす遺伝子発現及びエピゲノム制御因子との関連の一端を明らかにした。また、網羅的スクリーニングにより得られたエピゲノム因子が代謝リプログラミング、免疫微小環境構築等に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。治療抵抗性の獲得には所謂パーシスター細胞が治療初期から誘導されるモデルが提唱されており、我々の解析においても薬剤投与の初期からその発現が変化し、癌細胞の生存に寄与する遺伝子群を認めた。短期的な耐性獲得機序にもエピゲノム制御が強く関わることを示すデータも得られている。今後、シングルセル解析を加え、詳細な検討が必要と思われる。これらの因子の中には、癌種を超えて機能するものも存在することから、エピゲノム制御因子を標的とした治療法の開発に結びつくことが強く期待される。

#### V 研究成果の発表

##### 発表論文

Kumagai S, Koyama S, Itahashi K, Tanegashima T, Lin YT, Togashi Y, Kamada T, Irie T, Okumura G, Kono H, Ito D, Fujii R, Watanabe S, Sai A, Fukuoka S, Sugiyama E, Watanabe G, Owari T, Nishinakamura H, Sugiyama D, Maeda Y, Kawazoe A, Yukami H, Chida K, Ohara Y, Yoshida T, Shinno Y, Takeyasu Y, Shirasawa M, Nakama K, Aokage K, Suzuki J, Ishii G, Kuwata T, Sakamoto N, **Kawazu M**, Ueno T, Mori T, Yamazaki N, Tsuboi M, Yatabe Y, Kinoshita T, Doi T, Shitara K, Mano H, Nishikawa H. Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. *Cancer Cell* 40, 201-218.e9 (2022).

Nagasaki J, Inozume T, Sax N, Ariyasu R, Ishikawa M, Yamashita K, **Kawazu M**, Ueno T, Irie T, Tanji E, Morinaga T, Honobe A, Ohnuma T, Yoshino M, Iwata T, Kawase K, Sasaki K, Hanazawa T, Kochin V, Kawamura T, Matsue H, Hino M, Mano H, Suzuki Y,

Nishikawa H, Togashi Y. PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T cell clonotypes. *Cell Rep.* 38, 110331, (2022).

Kawazu M, Ueno T, Saeki K, Sax N, Togashi Y, Kaneseki T, Chida K, Kishigami F, Sato K, Kojima S, Otsuka M, Kawazoe A, Nishinakamura H, Maeda Y, Yamamoto Y, Yamashita K, Inoue S, Tanegashima T, Matsubara D, Tane K, Tanaka Y, Iinuma H, Hashiguchi Y, Hazama S, Khor SS, Tokunaga K, Tsuboi M, Niki T, Eto M, Shitara K, Torigoe T, Ishihara S, Aburatani H, Haeno H, Nishikawa H, Mano H. HLA Class I analysis provides insight into the genetic and epigenetic background of immune evasion in colorectal cancer with high microsatellite instability. *Gastroenterology* 162, 799-812, (2022).

UTX maintains the functional integrity of the murine hematopoietic system by globally regulating aging-associated genes. Sera Y, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Koide S, Kobayashi H, Ikeda KI, Kobatake K, Iwasaki M, Oda H, Wolff L, Kanai A, Nagamachi A, Inaba T, Sotomaru Y, Ichinohe T, Koizumi M, Miyakawa Y, Honda ZI, Iwama A, Suda T, Takubo K, Honda H. *Blood.* 2021 Feb 18 137(7):908-922.doi: 10.1182/blood.2019001044.

The KDM4B-CCAR-MED1 axis is a critical regulator of osteoblast differentiation and bone homeostasis. Yi SJ, Jang YJ, Kim HJ, Lee K, Lee H, Kim Y, Kim J, Hwang SY, Song JS, Okada H, Park JI, Kang K, Kim K. *Bone Res.* 9, 27 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00145-1>

Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion. Zhu C, Dixon KO, Newcomer K, Gu G, Xiao S, Zaghouani S, Schramm MA, Wang C, Zhang H, Goto K, Christian E, Rangachari M, Rosenblatt-Rosen O, Okada H, Mak T, Singer M, Regev A, Kuchroo V. *Sci Adv.* 7(18): eabd2710.doi: 10.1126/sciadv.abd2710.Print 2021 Apr.

Copper promotes tumorigenesis by activating the PDK1-AKT oncogenic pathway in a copper transporter 1 dependent manner. Guo J, Cheng J, Zheng N, Zhang X, Dai X, Zhang L, Hu C, Wu X, Jiang Q, Wu D, Okada H, Pandolfi PP, Wei W. *Advanced Science.* 2021, 2004303

KDM4B promotes acute myeloid leukemia associated with AML-ETO by regulating chromatin accessibility. Ueda T\*, Kanai A, Komuro A, Amano H, Ota K, Honda M, Kawazu M, Okada H\*. (\*co-correspondence) *FASEB BioAdvances.* 29 August 2021. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00030>

HB01-MLL interaction promotes AF4/ENL/P-TEFb-mediated leukemogenesis. Takahashi S, Kanai A, Okuda H, Miyamoto R, Komata Y, Kawamura T, Matsui H, Inaba T, Takaori-Kondo A, Yokoyama A. *Elife*. 2021 Aug 25;10:e65872.

HOXA9 promotes MYC-mediated leukemogenesis by maintaining gene expression for multiple anti-apoptotic pathways. Miyamoto R, Kanai A, Okuda H, Komata Y, Takahashi S, Matsui H, Inaba T, Yokoyama A. *Elife*. 2021 Jul 26;10:e64148.

Successful Cord Blood Transplantation for Idiopathic CD4+ Lymphocytopenia. Yamamoto K, Najima Y, Iizuka H, Harada Y, Sadato D, Kanai A, Matsui H, Inamoto K, Mukae J, Shingai N, Toya T, Igarashi A, Shimizu H, Kobayashi T, Kakihana K, Sakamaki H, Ohashi K, Harada H, Doki N. *Acta Haematol*. 2021;144(6):698-705.

Overexpression of Hmga2 activates Igf2bp2 and remodels transcriptional program of Tet2-deficient stem cells in myeloid transformation. Bai J, Yokomizo-Nakano T, Kubota S, Sun Y, Kanai A, Iimori M, Harada H, Iwama A, Sashida G. *Oncogene*. 2021 Feb;40(8):1531-1541.

Multiorgan failure with abnormal receptor metabolism in mice mimicking Samd9/9L syndromes. Nagamachi A, Kanai A, Nakamura M, Okuda H, Yokoyama A, Shinriki S, Matsui H, Inaba T. *J Clin Invest*. 2021 Feb 15;131(4):e140147.

Chida K, Kawazoe A, Kawazu M (co-first), Suzuki T, Nakamura Y, Nakatsura T, Kuwata T, Ueno T, Kuboki Y, Kotani D, Kojima T, Taniguchi H, Mano H, Ikeda M, Shitara K, Endo I, Yoshino T. A Low Tumor Mutational Burden and *PTEN* Mutations Are Predictors of a Negative Response to PD-1 Blockade in MSI-H/dMMR Gastrointestinal Tumors. *Clin. Cancer Res*. 27, 3714-3724 (2021).

Takeda Nakamura I, Ikegami M, Hasegawa N, Hayashi T, Ueno T, Kawazu M, Yagishita S, Goto Y, Shinno Y, Kojima Y, Takamochi K, Takahashi F, Takahashi K, Mano H, Kohsaka S. Development of an optimal protocol for molecular profiling of tumor cells in pleural effusions at single-cell level. *Cancer Sci*. 112, 2006-2019 (2021).

The histone demethylase JMJD2B regulates endothelial-to-mesenchymal transition. Glaser SF, Heumuller AW, Tombor L, Hofmann P, Muhly-Reinholz M, Fischer A, Gunther S, Kokot KE, Okada H, Hassel D, Kumar S, Jo H, Boon, RA, Abpanalp W, John D, Boeckel JN, Dimmeler S.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Feb 25;117 (8) 4180-4187.



*Kdm6a* Deficiency Activates Inflammatory Pathway, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with *p53* Dysfunction. Kobatake K, Ikeda K, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, Sentani K, Sera Y, Hayashi T, Koizumi M, Miyakawa Y, Inaba T, Sotomaru Y, Kaminuma O, Ichinohe T, Honda ZI, Yasui W, Horie S, Black PC, Matsubara A, Honda H. *Clin Cancer Res.* 2020 Apr 15; 26(8): 2065–2079.

Tsuzuki S, Yasuda T, Kojima S, Kawazu M, Akahane K, Inukai T, Imaizumi M, Morishita T, Miyamura K, Ueno T, Karnan S, Ota A, Hyodo T, Konishi H, Sanada M, Nagai H, Horibe K, Tomita A, Suzuki K, Muramatsu H, Takahashi Y, Miyazaki Y, Matsumura I, Kiyoi H, Hosokawa Y, Mano H, and Hayakawa F. Targeting MEF2D-fusion Oncogenic Transcriptional Circuitries in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discov.* 1, 82–95 (2020).

Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin. Oka N, Komuro A, Amano H, Dash S, Honda M, Ota K, Nishimura S, Ueda T, Akagi M, Okada H. *Pharmacology Research & Perspectives* 2020 Aug 8; 8(4)e00632.

Activation of CpG-Rich Promoters Mediated by MLL Drives MOZ-Rearranged Leukemia. Miyamoto R, Okuda H, Kanai A, Takahashi S, Kawamura T, Matsui H, Kitamura T, Kitabayashi I, Inaba T, Yokoyama A. *Cell Rep.* 2020 Sep 29;32(13):108200.

HHEX promotes myeloid transformation in cooperation with mutant ASXL1. Takeda R, Asada S, Park SJ, Yokoyama A, Becker HJ, Kanai A, Visconte V, Hersherberger C, Hayashi Y, Yonezawa T, Tamura M, Fukushima T, Tanaka Y, Fukuyama T, Matsumoto A, Yamasaki S, Nakai K, Yamazaki S, Inaba T, Shibata T, Inoue D, Honda H, Goyama S, Maciejewski JP, Kitamura T. *Blood.* 2020 Oct 1;136(14):1670–1684.

Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in ctDNA. Misawa K, Imai A, Matsui H, Kanai A, Misawa Y, Mochizuki D, Mima M, Yamada S, Kurokawa T, Nakagawa T, Mineta H. *Oncogene.* 2020 Jun;39(24):4741–4755.

Overexpression of RUNX3 Represses RUNX1 to Drive Transformation of Myelodysplastic Syndrome. Yokomizo-Nakano T, Kubota S, Bai J, Hamashima A, Morii M, Sun Y, Katagiri S, Iimori M, Kanai A, Tanaka D, Oshima M, Harada Y, Ohyashiki K, Iwama A, Harada H, Osato M, Sashida G. *Cancer Res.* 2020 Jun 15;80(12):2523–2536.

Characterization of a Novel Murine Colon Carcinoma Subline with High-Metastatic Activity Established by In Vivo Selection Method. Ma L, Sakamoto Y, Kanai A, Otsuka H, Takahashi A, Kakimi K, Imai T, Shimokawa T. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr



18;21(8):2829.

GLIS1, a novel hypoxia-inducible transcription factor, promotes breast cancer cell motility via activation of WNT5A. Shimamoto K, Tanimoto K, Fukazawa T, Nakamura H, Kanai A, Bono H, Ono H, Eguchi H, Hirohashi N. *Carcinogenesis*. 2020 Sep 24;41(9):1184-1194.

*Kdm6a* Deficiency Activates Inflammatory Pathways, Promotes M2 Macrophage Polarization, and Causes Bladder Cancer in Cooperation with *p53* Dysfunction. Kobatake K, Ikeda KI, Nakata Y, Yamasaki N, Ueda T, Kanai A, Sentani K, Sera Y, Hayashi T, Koizumi M, Miyakawa Y, Inaba T, Sotomaru Y, Kaminuma O, Ichinohe T, Honda ZI, Yasui W, Horie S, Black PC, Matsubara A, Honda H. *Clin Cancer Res*. 2020 Apr 15;26(8):2065-2079.

BRD4-Regulated Molecular Targets in Mantle Cell Lymphoma: Insights into Targeted Therapeutic Approach. Tsukamoto T, Nakahata S, Sato R, Kanai A, Nakano M, Chinen Y, Maegawa-Matsui S, Matsumura-Kimoto Y, Takimoto-Shimomura T, Mizuno Y, Kuwahara-Ota S, Kawaji Y, Taniwaki M, Inaba T, Tashiro K, Morishita K, Kuroda J. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020 Jan-Feb;17(1):77-89.

Intense Expression of EGFR L858R Characterizes the Micropapillary Component and L858R Is Associated with the Risk of Recurrence in pNOMO Lung Adenocarcinoma with the Micropapillary Component. Kishi N, Ito M, Miyata Y, Kanai A, Handa Y, Tsutani Y, Kushitani K, Takeshima Y, Okada M. *Ann Surg Oncol*. 2020 Mar;27(3):945-955.

Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, Vitaly K, Itahashi K, Maeda Y, Matsui S, Shibahara T, Yamashita Y, Irie T, Tsuge A, Fukuoka S, Kawazoe A, Udagawa H, Kirita K, Aokage K, Ishii G, Kuwata T, Nakama K, Kawazu M, Ueno T, Yamazaki N, Goto K, Tsuboi M, Mano H, Doi T, Shitara K, Nishikawa H. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat. Immunol*. 21, 1346-1358 (2020).

Kumagai S, Togashi Y, Sakai C, Kawazoe A, Kawazu M, Ueno T, Sato E, Kuwata T, Kinoshita T, Yamamoto M, Nomura S, Tsukamoto T, Mano H, Shitara K, Nishikawa H. An Oncogenic Alteration Creates a Microenvironment that Promotes Tumor Progression by Conferring a Metabolic Advantage to Regulatory T Cells. *Immunity* 53, 187-203 (2020).

Kinetics of cytokine receptor internalization under steady-state conditions

affects growth of neighboring blood cells. Nagamachi A, Kikuchi J, Kanai A, Furukawa Y, Inaba T. *Haematologica*. 2020 Jul;105(7):e325-e327.

Vgl12 Gene Alters the Gene Expression Profiling of Skeletal Muscle Subjected to Mechanical Overload. Hitachi K, Inagaki H, Kurahashi H, Okada H, Tsuchida K, Honda M. *Front. Sports Act. Living* (on line 9 Oct, 2019)

High Fat Diet Triggers a Reduction in Body Fat Mass in Female Mice Deficient for Utx demethylase. Ota K, Komuro A, Amano H, Kanai A, Ge K, Ueda T, Okada H. *Scientific Reports* 9, 10036 (2019)

Clonal hematopoiesis by SLIT1-mutated hematopoietic stem cells due to a breakdown of the autocrine loop involving Slit1 in acquired aplastic anemia. Hosokawa K, Mizumaki H, Elbadry MI, Saito C, Espinoza JL, Thi Thanh Dao A, Katagiri T, Harashima A, Kikuchi A, Kanai A, Matsui H, Inaba T, Taniwaki M, Yamamoto Y, Nakao S. *Leukemia*. 2019 Nov;33(11):2732-2766.

A cell-based high-throughput screening method to directly examine transthyretin amyloid fibril formation at neutral pH. Ueda M, Okada M, Mizuguchi M, Kluve-Beckerman B, Kanenawa K, Isoguchi A, Misumi Y, Tasaki M, Ueda A, Kanai A, Sasaki R, Masuda T, Inoue Y, Nomura T, Shinriki S, Shuto T, Kai H, Yamashita T, Matsui H, Benson MD, Ando Y. *J Biol Chem*. 2019 Jul 19;294(29):11259-11275.

Inoue S, Hirota Y, Ueno T, Fukui Y, Yoshida E, Hayashi T, Kojima S, Takeyama R, Hashimoto T, Kiyono T, Ikemura M, Taguchi A, Tanaka T, Tanaka Y, Sakata S, Takeuchi K, Muraoka A, Osuka S, Saito T, Oda K, Osuga Y, Terao Y, Kawazu M, Mano H. Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations. *Nat. Commun*. 10, 5785 (2019).

Oga T, Yamashita Y, Soda M, Kojima S, Ueno T, Kawazu M, Suzuki N, Nagano H, Hazama S, Izumiya M, Koike K, Mano H. Genomic profiles of colorectal carcinoma with liver metastases and newly identified fusion genes. *Cancer Sci*. 110, 2973-2981 (2019).

Namba S, Sato K, Kojima S, Ueno T, Yamamoto Y, Tanaka Y, Inoue S, Nagae G, Iinuma H, Hazama S, Ishihara S, Aburatani H, Mano H, Kawazu M. Differential regulation of CpG island methylation within divergent and unidirectional promoters in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 110, 1096-1104 (2019).

Takaoka K, Kawazu M (co-first), Koya J, Yoshimi A, Masamoto Y, Maki H, Toya T, Kobayashi T, Nannya Y, Arai S, Ueno T, Ueno H, Suzuki K, Harada H, Manabe A,

Hayashi Y, Mano H, Kurokawa M. A germline HMTF mutation in familial MDS induces DNA damage accumulation through impaired PCNA polyubiquitination. *Leukemia* 33, 1773-1782 (2019).

## 学会発表

オンコメタボライトによる毒性を回避する機構

上田 健, 古室 暁義, 天野 恭志, 本多 賢彦, 岡田 斉

日本生化学会大会プログラム・講演要旨集 94 回 [P-746] 2021 年 11 月

ヒストン脱メチル化酵素 UTX の欠損による乳がん細胞の浸潤能は BET 阻害剤で抑制される

古室 暁義, 上田 健, 岡田 斉

日本癌学会総会記事 80 回 [P9-2] 2021 年 9 月

Utx 欠損は高脂肪食により誘導される肥満を雌マウス特異的に抑制する

岡田 斉

第 48 回 日本分子生物学会年会 2019 年 12 月 3 日

ヒストン脱メチル化酵素 KDM6A の機能阻害は乳がん悪性化を促進する (Inhibition of histone demethylase KDM6A promotes breast cancer progression)

古室 暁義, 上田 健, 岡田 斉

日本癌学会総会記事 78 回 E-2084 2019 年 9 月

8;21 転座急性骨髄性白血病におけるエピゲノム調節因子の役割

上田 健, 金井 昭教, 古室 暁義, 天野 恭志, 岡田 斉

日本生化学会大会プログラム・講演要旨集 92 回 [1P-271] 2019 年 9 月

## 謝辞

当該研究に対する萌芽期からの貴重なご支援により、当初計画していた膵癌の病態解明のための実験系及び解析系の構築を行うことができました。また、共同研究者に恵まれ、膵癌の研究過程で樹立した実験系・評価系および、得られた知見を他の癌種の解析にも応用する機会を得ることができました。今後、確立した実験系にシングルセル解析、質量分析装置による解析等を加え、研究を継続する予定です。加えて、共同研究者の河津正人先生、金井昭教先生がそれぞれ、千葉県がんセンター、がん治療開発グループ 細胞治療開発研究部部長、東京大学大学院新領域創成科学研究科、特任准教授にご栄転される運びとなりました。改めまして貴財団のご支援に深謝致します。

ncRNA が関わる乳がんホルモン療法抵抗性獲得の個体レベルでの解析



## 〈研究の概要〉

エストロゲン受容体 (ER) 陽性型乳がんは、女性ホルモンのエストロゲン存在下で増殖するため、エストロゲンを阻害するホルモン療法 (内分泌療法) が有効である。しかし、治療中に高い頻度で再発することが問題である。また、術後 5 年以上の長い期間を経てもその再発リスクは高く晩期再発の頻度が高い。この晩期再発はがん幹細胞の特徴を獲得することを含め、様々な事象を経て長期休眠状態を維持する能力を反映していると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明で解明することが必要とされていた。

ヒト ER 陽性乳がん細胞株である MCF7 細胞が長期エストロゲン枯渇下で生き残った細胞は、LTED (long term estrogen deprivation) と呼ばれ、これは、ホルモン療法抵抗性再発乳がんのモデル細胞である。本研究者はこの細胞内において、タンパク質に翻訳されない ncRNA (non-coding, ノンコーディング RNA) 群が過剰発現することを見出し、これらを「エレノア」と命名した。エレノア ncRNA は、細胞核内で RNA クラウドとよばれる構造体を形成し、ER をコードする *ESR1* 遺伝子の転写を活性化することを見出していた。その機能はクロマチン調節因子として培養細胞実験系ではよく調べられていたものの、個体レベルでの役割は不明であった。

そこで、本研究では、細胞レベルで得た知見をもとに、マウスへの移植腫瘍とヒト乳がん患者組織を用いた実験を行い、エレノアの機能を明らかにすることを目的とした。

具体的には、病学的腫瘍径 2-5cm の原発性乳がん患者 185 例、および、ER 陽性原発性乳がんに対して手術が行われ、その後転移・再発して、転移・再発巣の生検が行われた患者 167 例を対象とし、エレノアプローブを用いた RNA-FISH と ER, PR に対する免疫染色を行った。得られた結果を統計解析し、病理因子との相関を調べた。マウスにおいては、ER 陽性ヒト乳がん細胞株を用いて、卵巣を除去した免疫不全マウスの乳腺組織近傍の脂肪細胞に移植し、増殖した腫瘍組織を用いて、定量 PCR、免疫染色、RNA-FISH を行った。また、LTED 細胞における RNA-seq と公開 ChIP-seq データの解析を行い、エレノアの発現と転写活性に特有のヒストン修飾パターン (エピゲノム) の相関を調べた。

これらの結果、エレノアの発現は、ER 陽性乳がん患者に限定して発現しており、特に、転移巣での ER とプロゲステロン受容体 (PR) の発現とよく相関していることがわかった。エレノア ncRNA の発現は、原発巣と転移巣のどちらでも検出され、閉経後の患者でよく認められた。また、術後 5 年以上の患者において再発率とエレノア陽性率の相関が認められ、エレノアが独立した再発リスク因子であることがわかった。

さらに、細胞株、マウスへのゼノグラフト、患者組織を用いた解析から、エレノアは乳がん幹細胞遺伝子である *CD44* の発現を活性化し、がん細胞の休眠状態を促進することが示唆された。

また、高次エピゲノム解析の結果、LTED 細胞において、エレノアが *ESR1* と、アポトーシスを誘導する *FOXO3* 遺伝子の相互作用を促し、ゲノムの立体構造形成を通して発現調節し、細胞増殖と細胞死のバランスを調節していることが明らかになった。これも長期休眠に関わる可能性がある。

本研究により、ncRNA は ER 陽性乳がんの晩期再発に機能をもつこと、さらに晩期再発の予測バイオマーカーおよび治療標的となりうることが明らかになった。

## 共同研究者の氏名・所属機関

大野 真司	がん研有明病院	乳腺センター
大迫 智	がん研究所	病理部
立和名 博昭	がん研究会	がん研究所 がん生物部
市川 雄一	がん研究会	がん研究所 がん生物部
福岡 恵	がん研究会	がん研究所 がん生物部
藤田 知子	がん研究会	がん研究所 がん生物部

## 研究報告

### I 研究目的

エストロゲン受容体 (ER) 陽性型乳がんは、女性ホルモンのエストロゲン存在下で増殖するため、エストロゲンを阻害するホルモン療法 (内分泌療法) が有効である。しかし、治療中に高い頻度で再発することが問題で、その原因解明と治療標的を同定することが重要である (図 1 上)。ER 陽性乳がん培養細胞である MCF7 細胞をエストロゲン枯渇下で培養して生き残る LTED 細胞は、このホルモン療法抵抗性再発乳がんのモデル細胞である (図 1 下)。

研究代表者の斉藤は、細胞核構造を基盤としたエピジェネティクス制御の研究を精力的にすすめてきた (Saitoh et al, *J. Cell Biol.* 1994, *EMBO* 2000, *Mol Biol.* 2004, 2012 他)。近年、LTED 細胞で、タンパク質に翻訳されない ncRNA (non-coding, ノンコーディング RNA) 群が過剰発現することを見出し、これらを「エレノア」と命名した。エレノア ncRNA は、細胞核内で RNA クラウドとよばれる構造体を形成し、ER をコードする *ESR1* 遺伝子座を活性化させることを見出した (Tomita et al, *Nat. Commun.* 2015, *WIREs RNA* 2016)。さらに、エレノアをノックダウンすると LTED 細胞の増殖が抑制されるなど、再発乳がんにおける ncRNA の重要性を明らかにした。

LTED 細胞にエストロゲンを投与すると、細胞死が誘導されるが、これはホルモン療法抵抗性の乳がん患者に対する「エストロゲン療法」を再現している (図 1 下)。その際にはエレノアが消滅し、*ESR1* 遺伝子の転写が抑制されることから、エレノアが治療標的となる可能性がある (図 1 下、Yamamoto et al, *Sci. Rep.* 2018)。エストロゲン療法は古くから知られているが、エストロゲンが乳がんの悪性因子であることと整合性がなく、治療メカニズムの解明が必要となっている。これらのことから本研究では、(1) 再発乳がんモデルにおける、エレノアの更なる機能を明らかにし、治療標的を探索すること、(2) これまでに細胞レベルで得た知見を、マウスへの移植腫瘍と実際の乳がん患者組織で検証すること、(3) エストロゲン療法に関する再発乳がんの治療標的をマウス個体にて検証することを目的とした。

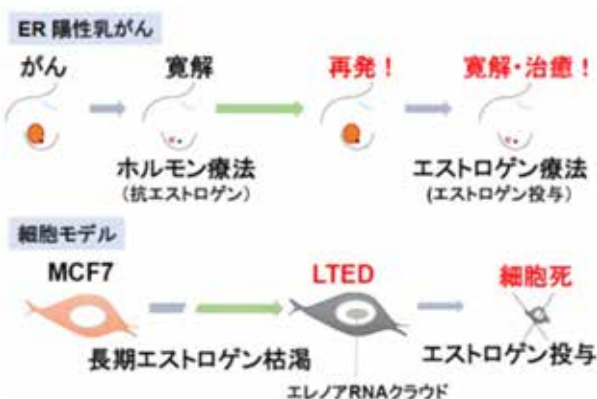


図 1 ER 陽性乳がんのホルモン療法抵抗性獲得とエストロゲン療法

## II 研究計画及び材料と方法

### (研究項目 1) エレノアクロマチンドメイン形成におけるエレノア ncRNA の機能解析

エレノア ncRNA は、*ESR1* 遺伝子座を含む 0.7Mb の広いクロマチン領域の非コード領域から転写される、一群のノンコーディング RNA である。再発乳がんにおいて、この領域が転写活性な巨大クロマチンドメインを形成しているかを明らかにするために、MCF、MCF7-LTED における RNA-Seq および公開 ChIP-Seq データの解析を行い、エレノア ncRNA の発現と転写活性に特有のヒストン修飾のパターン（エピゲノム）の相関を調べた。

### (研究項目 2) マウスへの移植がんにおけるエレノア ncRNA の発現解析

#### a. 乳がん細胞のマウス個体への移植系の確立

LTED 細胞は、ヒト乳がん細胞株である MCF7 細胞をエストロゲン枯渇下で長期培養して樹立される、ホルモン療法抵抗性再発乳がんモデルである。これを種々の条件下で、卵巣除去した免疫不全マウス（NOD/Scid、♀、8 週齢）の背面皮下、または下腹部乳腺付近の脂肪組織へ移植した。その後、1 週間ごとに体重を測定し、10 日以降に、ノギスによる腫瘍サイズの測定を行った。さらに 2-3 か月後に剖検し、移植したがんを回収した。また同様の解析を、別の ER 陽性乳がん細胞株である HCC1428、およびトリプルネガティブ乳がん細胞株である MDA-MB231 を用いて行った。さらに、がん研有明病院乳腺センターで取得された乳がん組織由来の細胞株（XENO25）をマウス個体へ移植する準備を行うために、細胞の培養と *ESR1* の発現解析などを行った。なお、細胞移植の前には、マウス B 型肝炎ウイルス、マイコプラズマへの感染がないことを、PCR により確認した。

#### b. マウス個体におけるエレノア ncRNA の腫瘍形成・増殖能の解析

エレノア ncRNA のマウスモデルにおける腫瘍増殖能を評価するため、卵巣除去にてエストロゲン枯渇状態を再現した免疫不全マウス（NOD/Scid、♀、8 週齢）の下腹部乳腺近傍の脂肪組織内に、 $5 \times 10^6$  個の ER 陽性乳がん細胞株 HCC1428、またはそこから樹立した HCC1428-LTED 細胞をマトリゲルと混合し、各細胞群をマウス 8 匹ずつに移植した。腫瘍細胞移植後、1 週間ごとに腫瘍体積<sup>注1</sup>を測定し、腫瘍形成、増殖能を評価した。3 か月後に移植腫瘍を摘出し、ヘマトキシリン-エオジン染色、定量 PCR、ER、CD44 の免疫染色、エレノアのプローブを用いた RNA-FISH を行った。

注1) 腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) = 長径 (mm) × [短径 (mm)]<sup>2</sup> × 1/2

### (研究項目 3) 乳がん患者由来の組織標本におけるエレノア ncRNA の発現解析

原発乳がんにおけるエレノアの発現解析をするために、患者由来組織切片を用いた RNA-FISH を行った。対象症例は、2005 年から 2006 年にがん研有明病院で手術が行われた病理学的腫瘍径 2-5cm (pT2) の原発性乳がん 185 例とした。また、原発巣と再発腫瘍がペアで得られる組織切片を用いて、エレノアクラウドの検出を行い、比較解析を行った。得られたデータは、臨床病理学的因子及び予後との相関を検討した。

まず、各組織の FFPE を用いて、RNA-FISH 法でエレノア ncRNA の発現解析を行った。コホート①は、2005 年から 2006 年にがん研有明病院で手術が行われた病理学的腫瘍径 2-5cm の原発性乳がん患者 185 例、コホート②は、2000 年から 2016 年にがん研有明病院で ER 陽性原発性乳がんに対して手術が行われ、その後転移・再発して、転移・再発巣の生検が行われた患者 167 例を対象



とした。RNA-FISH 法で、がん細胞の核内に観察されるエレノアクラウドをスコア 0（エレノアクラウドなし）、スコア 1（エレノアクラウド小）、スコア 2（エレノアクラウド大）に分類し、以下スコア 1, 2 をエレノア陽性と判定した（図 2）。コホート①では、エレノア ncRNA 発現と臨床病理学的因子及び予後との相関を解析し、コホート②では、エレノア ncRNA 発現の転移・再発後の変化を検討した。統計解析は、2 群間の割合の比較には Pearson のカイ 2 乗検定、生存曲線の推定には Kaplan-Meier 法、2 群間の生存曲線の比較には log-rank 検定を用いた (JMP®13.2.1 software)。P 値 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

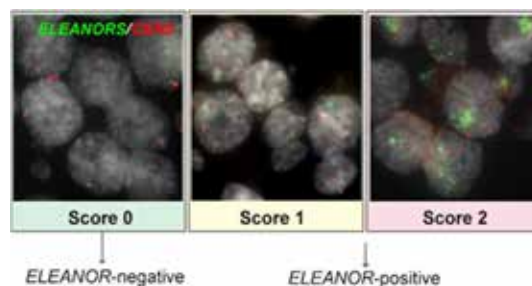


図 2 RNA-FISH 法によるエレノアスコア分類

#### (研究項目 4) エレノア ncRNA と乳がん幹細胞との関わりについての解析

##### a. LTED 細胞における幹細胞の解析

LTED 細胞の幹細胞能を解析するために、スフィアアッセイと FACS 解析を行った。エレノアの発現を低下させる LNA (locked nucleic acid) や siRNA が、LTED 細胞のスフィア形成能、幹細胞集団の維持に影響するかを調べた。

##### b. 移植マウスにて形成された腫瘍における CD44 の発現解析

ER 陽性乳がん HCC1428、トリプルネガティブ乳がん MDA-MB-231, MDA-MB-468 をそれぞれ免疫不全マウス (NOD/Scid, ♀, 8 週齢) の下腹部乳腺付近の脂肪組織へ、HCC1428-LTED 細胞は卵巣除去した免疫不全マウスの下腹部乳腺付近の脂肪組織へ移植した。2-3 か月後に、形成された腫瘍細胞を回収し、CD44、エレノア、ESR1 の発現を調べた。

##### c. 乳がん患者由来の組織標本における CD44 の発現解析

乳がんにおける CD44 とエレノアの発現頻度と臨床的意義の関連を明らかにするために、患者組織における CD44 の発現解析を行った。コホート①の RNA-FISH 法によるエレノア発現解析で用いたものと同一の患者由来の組織標本に対して、免疫染色法による CD44 の検出を行った。CD44 の発現レベルは、染色強度と染色占有率を指標とした Allred score システムにより、0-5 に分類した。

### III 研究成果

#### (研究項目 1) エレノアクロマチンドメイン形成におけるエレノアの機能解析

エピゲノム解析の結果、LTED 細胞において、転写活性に関わるヒストン H3K27 のアセチル化や H3K36 のトリメチル化が、エレノアクロマチンドメインで亢進していること、エレノアがゲノムの立体構造形成に関わることなどが明らかになった（図 3）。これら結果の一部を論文報告した (Abdalla MOA et al, *Nature Commun.*, 2019)。

#### (研究項目 2) マウスへの移植がんにおけるエレノア ncRNA の発現解析

##### a. 乳がん細胞のマウス個体への移植系の確立

乳がん細胞株をマウスに移植するために様々な条件を検討した。その結果、乳腺付近の脂肪に

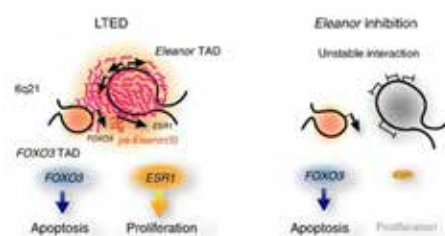


図 3 エレノアが、ESR1 を含む転写活性の高い TAD を構築し、他の TAD と相互作用することで、細胞増殖とアポトーシスのバランスを保っている。

において、移植箇所あたり  $10^6$  個程度の細胞をマトリゲルと混合した状態で注入する方法が、最適であることがわかった。期待されたとおり、トリプルネガティブ MDA-MB231 細胞の移植では、高い腫瘍形成能が観察された。再発乳がんモデル細胞である LTED 細胞の皮下移植でも、一定の腫瘍の生着が観察された。これにより、エレノアの阻害試薬である LNA (locked nucleic acid) や、グリセオリン I の腫瘍抑制効果を個体にて検討することを可能とした。

#### b. マウス個体におけるエレノア ncRNA の腫瘍形成・増殖能の解析

エストロゲン枯渇状態を再現したマウスモデルを用いて、HCC1428 と HCC1428-LTED 細胞移植群の腫瘍増殖能を比較した結果、HCC-1428 細胞群では腫瘍は形成されず、エレノア ncRNA が高発現する HCC1428-LTED 細胞移植群では腫瘍形成を認めた (図 4)。エレノア ncRNA は試験管内の結果と同様に、マウスモデルにおいてもエストロゲン枯渇状態に

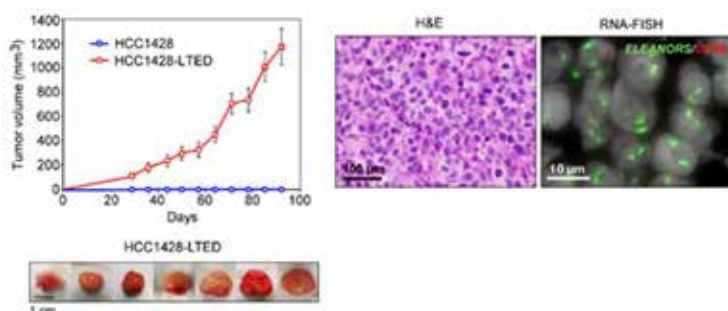


図 4 卵巣除去マウスにおいて、LTED 細胞のみが増殖した (左)。また、その組織ではエレノアの発現が亢進していた (右)。

耐性を示すことが確認された。本研究助成支援により、マウス個体における解析系が順調に確立された。

#### (研究項目 3) 乳がん患者由来の組織標本におけるエレノア ncRNA の発現解析

コホート①: 原発性乳がん 178 例 (判定不能 8 例を除外) の RNA-FISH 解析の結果、58 例 (33%) にエレノアクラウドを認めた。乳がんサブタイプ別のエレノア ncRNA 陽性率は、Luminal A で 43%、Luminal B で 37%、Luminal-HER2 タイプで 57% であり、HER2 陽性 (ER 陰性) 及びトリプルネガティブ乳がんは全例で陰性であった。ER 陽性群 141 例の解析では、エレノア ncRNA と免疫染色による ER の発現強度に正の相関が認められた。予後は、エレノア発現群で術後 5 年以降の晩期再発が増加する傾向が認められ (図 5)、多変量解析によりエレノア ncRNA 発現が独立した再発リスク因子であることが示された (HR=2.40, P=0.014)。

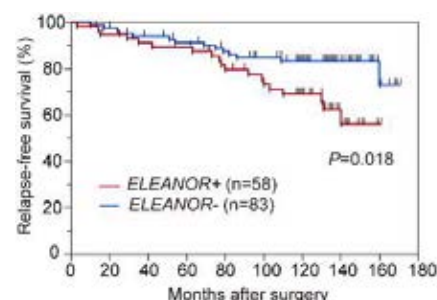


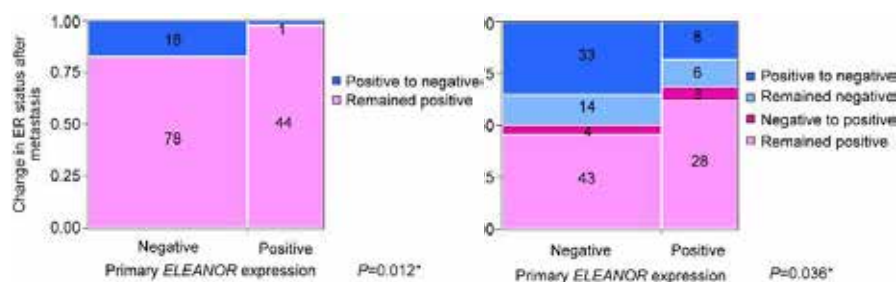
図 5 ER 陽性乳がん 141 例のエレノア発現と無再発生存率

コホート②: 転移・再発乳がん 139 例 (判定不能 28 例を除外) における原発巣と再発巣のエレノア ncRNA の発現を比較したところ、31/47 症例で原発巣のエレノアの発現が転移・再発後も維持された (図 6)。また、原発巣でエレノア ncRNA が発現した症例では、再発後の ER/PgR の陰転化率が低く (図 7)、転移巣のエレノア ncRNA の発現は原発巣より ER/PgR の発現に強い相関が認められ、エレノア ncRNA が ER 経路に依存的ながんの転移・再発を促すことが示唆された。



図 6 ER 陽性乳がん 139 例における再発後のエレノア発現の変化

これらの結果から、ER 陽性乳がんにおけるエレノア ncRNA の再発予測マーカーや治療標的としての臨床的有用性が示唆された。



#### (研究項目 4) エレノア ncRNA と 図 7 原発巣のエレノア発現と再発後の ER(左)と PgR (右) 乳がん幹細胞との関わりについて の解析

##### a. LTED 細胞における幹細胞の解析

ER 陽性 HCC1428 細胞株とその LTED 細胞を用いて、スフィアアッセイを行った (図 8)。その結果、HCC1428-LTED 細胞において、幹細胞の特徴のひとつであるスフィア形成能が有意に高かった (図 1)。また、細胞集団中の

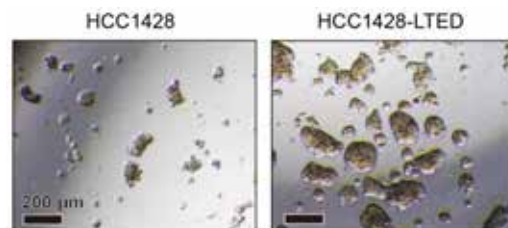


図 8 スフィアアッセイによる形成能

乳がん幹細胞 (CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-/low</sup>) について、FACS を用いて解析したところ、LTED 細胞には 15 %程度存在していた。LNA 処理によりエレノアをノックダウンしたところ、この幹細胞集団が 6.9 %に減少した。これらのことから、エレノアが、幹細胞様の性質に関与していることが明らかとなった。

##### b. 移植マウスにて形成された腫瘍における CD44 の発現解析

免疫不全マウスに LTED 細胞を移植して腫瘍を形成させ、定量 PCR を行ったところ、HCC1428-LTED 細胞ではコントロールの HCC1428 に比べて 4 倍近く CD44 の発現が上昇していた。これは幹細胞に近いトリプルネガティブ細胞 MDA-MB231 が形成する腫瘍と同様のレベルであった。これらの腫瘍由来の組織切片を用いて免疫染色を行ったところ、定量 PCR の結果と同様に、LTED 細胞における CD44 の発現はコン

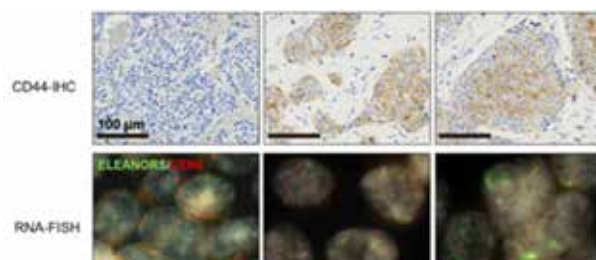


図 9 乳がん患者におけるエレノアと CD44 の発現

トロール細胞より高く、MDA-MB231 細胞と同等であった。RNA-FISH により、移植 LTED

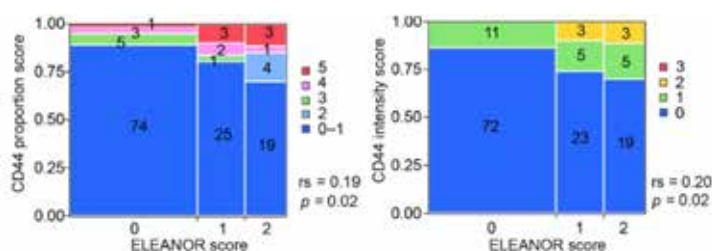


図 10 エレノア発現と CD44 の染色比率 (左) と 染色強度 (右) との相関定量解析

細胞でエレノアクラウドと CD44 遺伝子が高頻度で共局在しており、エレノアが CD44 の遺伝子発現を直接活性化している可能性が示唆された。

##### c. 乳がん患者由来の組織標本における CD44 の発現解析

乳がん患者由来の組織標本を用いて、CD44 の免疫染色を行った (図 9)。その結果、エレノアと、CD44 発現レベルに一定の正の相関が認められた (図 10)。細胞株同様にヒト乳がん患者においても、エレノアが CD44 の発現活性化を通して、乳がん幹細胞能を維持することがわかった。エレノアの幹細胞維持機能が、晩期再発におけるがんの長期休眠に寄与する可能性があるものと考えている。

#### IV 考察

本研究では、原発性および転移性乳がんにおけるエレノアの臨床病理学的特徴を検討した。その結果、すべてのサブタイプの原発巣において、33%がエレノア陽性であり、かつER陽性であることが明らかとなった。逆に、ER陽性の原発巣のうち、約41%がエレノア陽性であり、術後5年以降に再発する可能性が高いことがわかった。エレノア陽性率と*ESR1*の発現強度、および*CD44*の発現との間には強い相関があり、このことから、エレノアは乳がん細胞の長い休眠状態に寄与している可能性があることがわかった(図11)。本研究によって、晩期再発の新たな分子機構と、晩期再発マーカーとしてのエレノアの重要性を明らかにしたと考える。

晩期再発において、DTC(がん組織由来細胞)は、がん治療や免疫防御などの微小環境から自身を守るために、休眠状態にする能力と同時に、転移、腫瘍形成能を維持していることも知られている(*Clin. Cancer Res.* 2013, *J. Clin. Med.* 2013, *Cancers* 2019)。これまでの研究から、DTCの大部分を占める乳がん幹細胞は、化学療法や内分泌療法に対する耐性を獲得する上で重要な役割を担っていることが示唆されている(*Sci. Rep.* 2017, *EMBO Mol. Med.* 2014, *Breast Cancer* 2019)。また、内分泌療法に対する抵抗性は、ERシグナルや成長シグナルの活性化など、複雑なネットワークによって制御されている(*Cancers* 2019, *Endocr. Relat. Cancer* 2005, *Endocr. Metab. Disord.* 2007)。実際に内分泌療法抵抗性乳がんにおいては、ER陽性の状態が維持されている(*Cancer Res.* 2012, 1995)。また、転移性乳がんのうち約20%はER陽性という高頻度であるにもかかわらず、*ESR1*変異は未治療の原発腫瘍ではまれ(1%未満)であるという、The Cancer Genome Atlasのデータも存在する(*Nat. Genet.* 2013)。転移巣におけるエレノアの発現は、ERおよびPgRとともに検出されていることから、ER陽性乳がんにおける内分泌抵抗性と再発におけるERシグナル活性にエレノアは大きく関与していることが考えられる。ncRNAに関するこれまでの研究を含めて、我々はエレノアが乳がん幹細胞の制御に関与していることを提案する。

初期診断時や内分泌療法後での晩期再発リスクを予測することも、ER陽性乳がん患者を管理する上で重要である。がん細胞のグレードや腫瘍サイズなどの臨床病理学的パラメータは、5年後の予後を予測する上では判断が難しいため、CTS5や49遺伝子シグネチャなど、より正確なスコアリングシステムが提案されてきた(*J. Clin. Oncol.* 2018, *PLoS One* 2012)。本研究での多変量解析により、エレノアがER陽性乳がんの独立した再発リスク因子であることが示されたことから、エレノアは、術後5年以降の再発リスクを予測できる新たなパラメータと考えられる。

ER陽性乳がん患者において、エレノアは原発巣と転移巣に同程度の割合(29%~32%)で検出された。AI療法を再現した長期間エストロゲン枯渇下において、増殖する再発ER陽性乳がんモデルLTED細胞で、エレノアの発現増加が認められていたため(Tomita et al, *Nat. Commun.* 2015)、実際のER陽性乳がん患者での結果は、やや意外であった。本研究では、エレノアの発現とホルモン療法(AI, アロマターゼ阻害剤)との間にわずかな相関を認めたが、統計学的に有意ではなかった。一方、閉経後や50歳以上の年齢との間に有意な相関があることが検出された。従って、乳がんでは閉経後のエストロゲン低下により、エレノアの発現が誘導される可能性がある。また、元のMCF7細胞は、FISHとトランスクリプトーム解析の両方の結果より、わずかではあるがエレノアが検出されていることも注目すべき点である。

本研究での*in vivo*(培養細胞における)実験の結果は、*in vitro*実験の結果をよく反映していた。例えば、乳がん患者では、エレノアncRNAの発現はERの発現と有意に相関していた。エレ



ノア ncRNA は、転写活性の高い TAD を構築し、その中の遺伝子 (*ESR1* およびその近傍の 3 つの遺伝子) を活性化する新しいタイプの ncRNA として知られている (Abdalla et al, *Nat. Commun.* 2019, *Wiley Interdiscp. Rev.* 2017)。また、この TAD は、6 番染色体上の *ESR1* から 42.9Mb 離れたアポトーシスを誘導する転写因子 FOXO3 を含む別の TAD とも相互作用していた。我々は、この相互作用が長距離クロマチン相互作用を通じて、細胞増殖とアポトーシスという相反する 2 つの機能に対して、エレノアはバランスをとる役割を担っていることを明らかにした。がん細胞の増殖とアポトーシスの平衡は、がん細胞の休眠にも関与していることが示唆されており、我々の結果に一致する。

*CD44* 遺伝子座はエレノア (第 6 染色体) とは異なる染色体 (第 11 染色体) に位置している。RNA-FISH 解析の結果から、エレノアと *CD44* がトランスに相互作用していることと、エレノアが離れた遺伝子の転写調節にも関与している可能性が示唆された。*CD44* タンパク質は細胞接着分子であり、乳がん幹細胞様マーカーである。がん細胞における休眠状態を維持する重要な構成因子であると考えられる。*CD44* mRNA は、乳がんのサブタイプによって発現するアイソフォームが異なり、幹細胞の維持において特定のバリエントタイプが重要であることが報告されている (*BMC Cancer* 2011)。また、*CD44* は、血流にのって循環するがん細胞と遠位の内皮細胞との接着を増強することにより、転移能を獲得することも報告されている (*Cancer Res.* 2004, 2006, *Neoplasia* 2014)。LTED 細胞でエレノアをノックダウンすると、乳がん幹細胞の数と *CD44* の発現が減少し、これは ER タンパク質 (ER シグナル) の減弱では見られなかった。逆に、エレノアを過剰発現させると、*CD44* の発現が増加することによってスフィア形成能が高くなり、卵巣除去マウスにおいて、移植した LTED 細胞が腫瘍を形成したことから、エレノアと乳がん幹細胞との関与が示唆された。本研究から、エレノアが晩期再発において何らかの機能をもたらしている可能性が示された (図 11)。細胞増殖とアポトーシスの間の平衡を保つことに加えて (図 11、左および中央)、エレノアは *CD44* 遺伝子を活性化し、これにより、休眠状態の乳がん幹細胞の性質を持つ細胞が生き残り、やがて活性化し、転移能を獲得し、それに伴い、ER 活性化による増殖能が増加することになるものと考えられる (図 11)。

本研究結果より、エレノアは ER 陽性乳がんの晩期再発を予測するマーカーであり、晩期再発の治療標的候補であると考えられる。本研究は、ノンコーディング RNA が制御するがんの発生、進展、転移に関する研究に新たな知見を提供するものである。

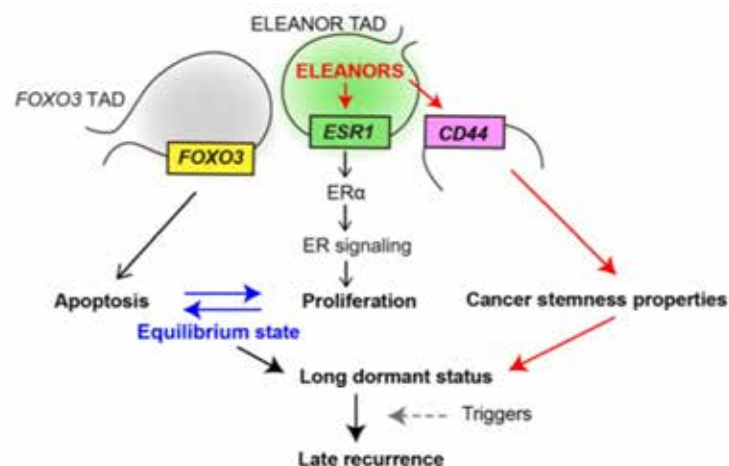


図 11 本研究によって示されたエレノアの意義

## V 研究成果の発表

- 1) Abdalla, M.O.A., Yamamoto, T., Maehara, K., Ohkawa, Y., Miura, H., Hiratani, I., Nakayama, H., Nakao, M., and Saitoh, N.\*  
The Eleanor ncRNAs activate the topological domain of the ESR1 locus to balance against apoptosis. *Nat. Commun.*, 10(1), 3778, 2019, doi:10.1038/s41467-019-11378-4
- 2) Tachiwana, H., Yamamoto, T., Saitoh, N.\*  
Gene regulation by non-coding RNAs in the 3D genome architecture. *Current Opinion in Genetics and Development*, 61:69-74, 2020, doi:10.1016/j.gde.2020.03.002
- 3) Nozawa, R., Yamamoto, T., Takahashi, M., Tachiwana, H., Maruyama, R., Hirota T., Saitoh, N\*.  
Nuclear microenvironment in cancer: control through liquid-liquid phase separation. *Cancer Sci*, 111(9):3155-3163, 2020, doi:10.1111/cas.14551
- 4) Tachiwana, H., Dacher, M., Maehara, K., Harada, A., Seto, Y., Katayama, R., Ohkawa, Y., Kimura, H., Kurumizaka, H., Saitoh, N.  
Chromatin structure-dependent histone incorporation revealed by a genome-wide deposition assay. *eLife* 10:e66290, 2021, doi: 10.7554/eLife.66290
- 5) Tachiwana, H., Saitoh, N\*.  
Nuclear long non-coding RNAs as epigenetic regulators in cancer. *Current medicinal chemistry*: in press, 2021, doi:10.2174/0929867328666210215114506
- 6) Ichikawa, Y., Saitoh, N.  
Shaping of genome by long noncoding RNAs. In books *Cytogenomics*, 357-372, 2021, doi:10.1016/B978-0-12-823579-9.00018-7
- 7) Matsumori, H., \*Watanabe, K., Tachiwana, H., Fujita, T., Ito, Y., Tokunaga, M., Sakata-Sogawa, K., Osakada, H., Haraguchi, T., Awazu, A., Ochiai, H., Sakata, Y., Ochiai, K., Toki, T., Ito, E., Goldberg, I., G., Tokunaga, K., Nakao, M., Saitoh, N.  
Ribosomal protein L5 facilitates rDNA-bundled condensate and nucleolar assembly. *Life Science Alliance*, 5(7):e202101045, doi: 10.26508/lsa.202101045.
- 8) Fukuoka, M., Ichikawa, Y., Osako, T., Fujita, T., Baba, S., Takeuchi, K., Tsunoda,

N., Ebata, T., Ueno, T., Ohno, S., \*Saitoh, N.

The ELEANOR non-coding RNA expression contributes to cancer dormancy and predicts late recurrence of ER-positive breast cancer. *Cancer Science*, doi: 10.1111/cas.15373. Online ahead of print.

9) 特許申請：

発明の名称：E R陽性乳がんの晩期再発を検査する方法、及び治療薬のスクリーニング方法

出願番号：特願 2022-65345／2022/4/11

特許権者：公益財団法人がん研究会

発明者：福岡 恵、市川 雄一、大迫 智、藤田 知子、上野 貴之、斉藤 典子

がん細胞上分子会合体を標的とした新規抗体医薬創薬システムの構築





<<研究の概要>>

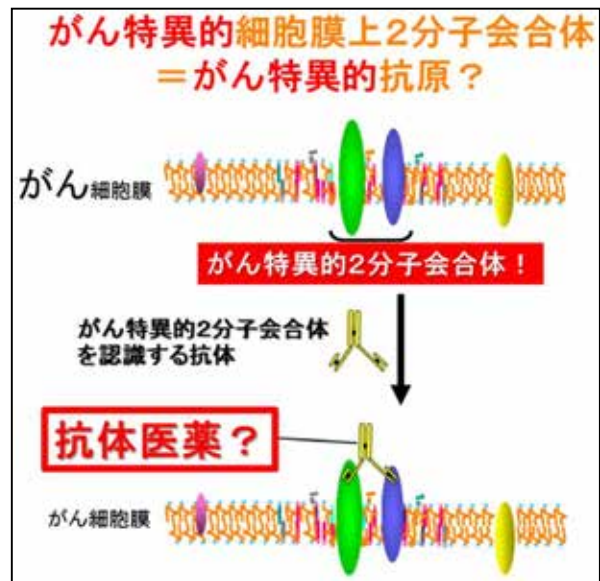
がん細胞上の標的分子に結合し治療効果を発揮する分子標的薬は、近年開発が進行し、多くの症例で使用されるようになった。特に抗体医薬は、リツキシマブなど奏効率が高いものが汎用されている。しかし、最近は抗体医薬の標的分子の新規発見数が頭打ちになっており、この問題を解決し抗体医薬のさらなる発展を目指すためには、全く新奇な標的分子探索法を含む創薬システムの構築が必要になる。

申請者は、新奇な分子標的として「細胞膜上2分子会合体」(右図参照)に着目した。2分子会合体は細胞膜上の分子(受容体などのタンパク質)が膜流動現象によって会合し形成されるもので、細胞の種類、活動や機能に依存してそれぞれ特異的な会合体が形成されることが分かっている。従って、がん細胞特異的に形成される2分子会合体を探索・同定できれば、それらが新奇な標的分子(分子会合体がん抗原)となり、これらを認識する抗体は、新奇抗体医薬となりうるのではないかと考えた。会合体がん抗原は、EMARS 法

(Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources)という申請者らが開発した生理的かつ簡便な技術を基盤としたスクリーニング法で探索した。これまでに申請者らは、肺がんモデルマウス *EML4-ALK* transgenic mouse から採取した肺がん初代細胞及びヒト肺がん細胞を用いて、肺がん細胞上の2分子会合体抗原について数種類同定した。さらに検討を重ねた結果、同定した分子会合体がん抗原候補の中から、CHL1- $\alpha$ 2 integrin 会合体がヒト肺がん患者組織(55例)に有意に高発現していることを見出した。

そこで申請者らは次のステップとして、上記 CHL1- $\alpha$ 2 integrin 会合体を認識する抗体を作製するスキームを構築し、最終的にこれまでの研究成果と融合させた「分子会合体認識抗体医薬創薬システム」を確立するため、三重大大学の共同研究者が有する立体構造特異的ターゲティング(SST)法によるモノクローナル抗体作製を実施し、CHL1- $\alpha$ 2 integrin 会合体認識抗体のハイブリドーマ樹立を試みた。

本研究は、抗体医薬新規標的枯渇問題の解決手段として必要性の高い研究であり、分子会合体をがん抗原として創薬に利用する研究は今のところ世界的に見ても事例がなく、競合者も存在しないため、独創性の高い有用な研究である。さらに、CHL1- $\alpha$ 2 integrin 会合体認識抗体が作製できれば、がん治療における初の会合体がん抗原認識抗体医薬としての利用が期待される。



## 共同研究者の氏名・所属機関

- ・中野 貴成 埼玉医科大学 医学部
- ・富田 昌弘 三重大学大学院 工学研究科
- ・湊元 幹太 三重大学大学院 工学研究科

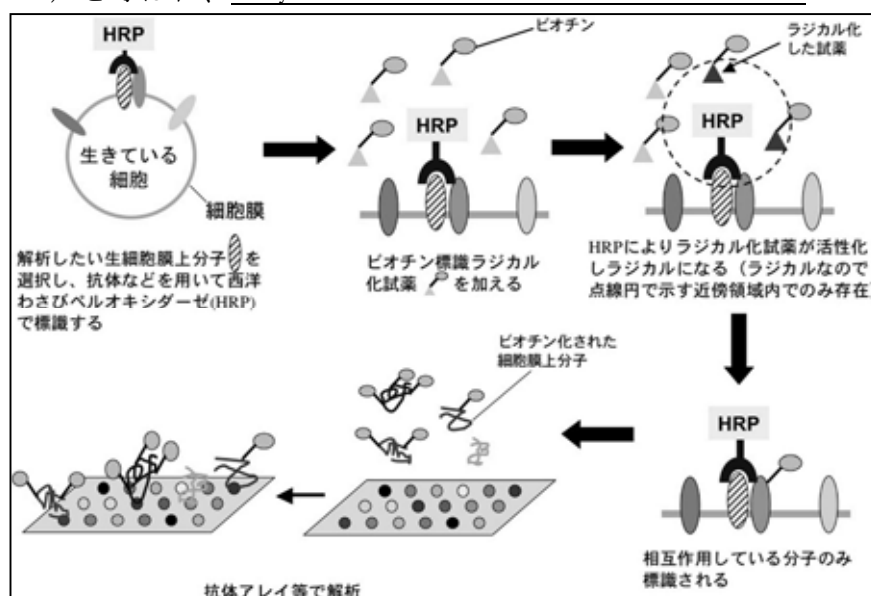
## 研究報告

### I 研究目的

1972 年、Singer と Nicolson は動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常時ダイナミックに運動していることを提唱した (Singer, S.J., Nicolson, G.L.: Science 175: 720-731(1972))。

1990 年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で集合、拡散を繰り返す「細胞膜上分子間相互作用」が確認され、細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた。このような学術的な背景の中、申請者は全く新規で実用的な細胞膜上分子間相互作用解析法の開発に成功した。本法は細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法 (Kotani N. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. (2008) 105:7405-9、特許出願済 特願 2007-017667, PCT/JP2008/051002) と呼ばれ、Enzyme-Mediated Activation of Radical

Sources (EMARS) と名付けた反応を利用して行われる (右記説明図参照)。本解析法は特別な装置を必要とせず、簡便に生理的条件下で相互作用した細胞膜上分子を網羅的に同定できるため、今後細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与することが期待されている。



このような申請者は、生化学的可視化法が基礎研究のみならず医学、薬学分野の応用研究へも適応可能ではないかと考えた。文献調査を行なうと、抗体医薬品、特に B 細胞リンパ腫治療用抗体医薬品の薬理作用に細胞膜上分子間相互作用が関与している可能性を示唆した文献がいくつか存在した。そこで、申請者らは B 細胞リンパ腫治療用抗体医薬品として用いられている抗 CD20 モノクローナル抗体リツキシマブ、および同じ抗 CD20 モノクローナル抗体だが抗体医薬品としては用いられていない 2H7 抗体に HRP を結合させ上記 EMARS 反応を行った。その結果、CD20 と相互作用する分子が 2 抗体処理間で異なっている

ことを見出した。また、この解析により FGFR3 がリツキシマブ処理時にのみ CD20 と相互作用することが判明し、薬剤にて FGFR3 のリン酸化を阻害するとリツキシマブ依存的細胞障害が抑制されることも見出した。さらに、CD20 と同様に B 細胞リンパ腫細胞に発現している CD90 においても、その分子間相互作用が抗 CD90 抗体処理による B 細胞リンパ腫細胞の細胞障害効果に影響している可能性を見出した。これらの結果から、抗体医薬品の薬理活性に細胞膜上分子間相互作用が影響している可能性が示唆され、申請者は分子間相互作用、ひいては生化学的可視化法を抗体医薬品創薬に活かせるのではないかと考えた。

その一方、上記研究の過程において申請者は、抗体医薬処理前においても細胞種や組織に依存した細胞膜上分子間相互作用が存在し、その結果それぞれで特異的な「細胞膜上 2 分子会合体」（以下、2 分子会合体）が形成されている事に気がついた。もし、疾患細胞特異的に形成されている 2 分子会合体を同定し、それを認識する抗体を産生できれば、既存探索法に依らない全く新規の抗体医薬品が創薬できるのではないかと着想した。本研究では肺がん焦点を絞り、申請者らが開発した生化学的可視化法を利用してがん細胞特異的な 2 分子会合体を探索し、三重大大学の共同研究者が有する立体構造特異的ターゲットング（SST）法による抗体作製法による抗体樹立を行い、最終的に新しい視点に立った抗体医薬創薬システムの開発に結びつけることを目的とする。

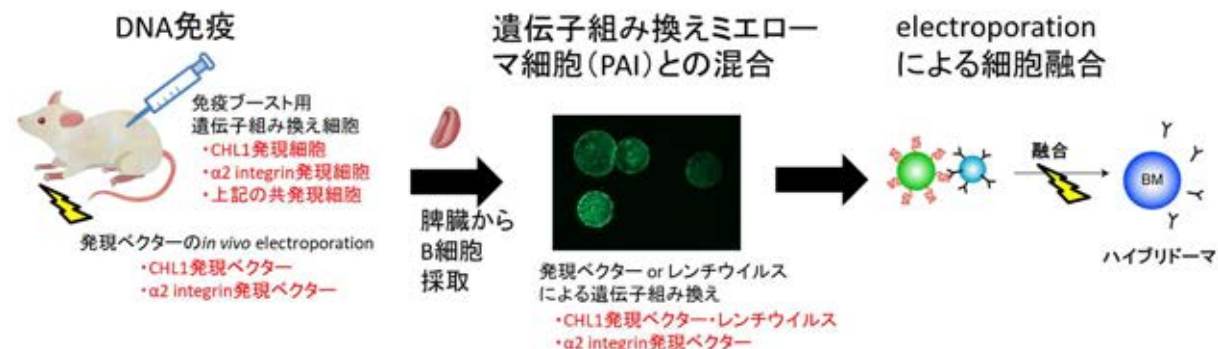
## II 研究計画および材料と方法

### ＜材料＞

- human CHL1 cDNA
- human  $\alpha 2$  integrin cDNA
- HEK293 細胞
- CHO-K1 細胞
- P1E6 細胞 (Developmental Studies Hybridoma Bank - DSHB から購入)
- pcDNA3.1-zeo
- pLenti-CMV-T0
- pPAX2 および pMD2.G
- pENTR
- テトラサイクリン誘導型 Tet-On ベクター (タカラバイオ・クローンテック)
- QIAGEN Midiprep kit
- QIAGEN Maxiprep kit
- Lipofectamine reagent (Thermo Fisher Scientific)
- zeocin
- puromycin
- Transfection kit GenomONE-GX (Ishihara Sangyo)
- Nucleofector™ electroporation devise (Lonza)
- 細胞株 Nucleofector™ II/2b kit (Lonza)
- AlphaLISA ドナービーズおよびアクセプタービーズ kit (Perkin Elmer)
- BTX ECM830 electroporation devise

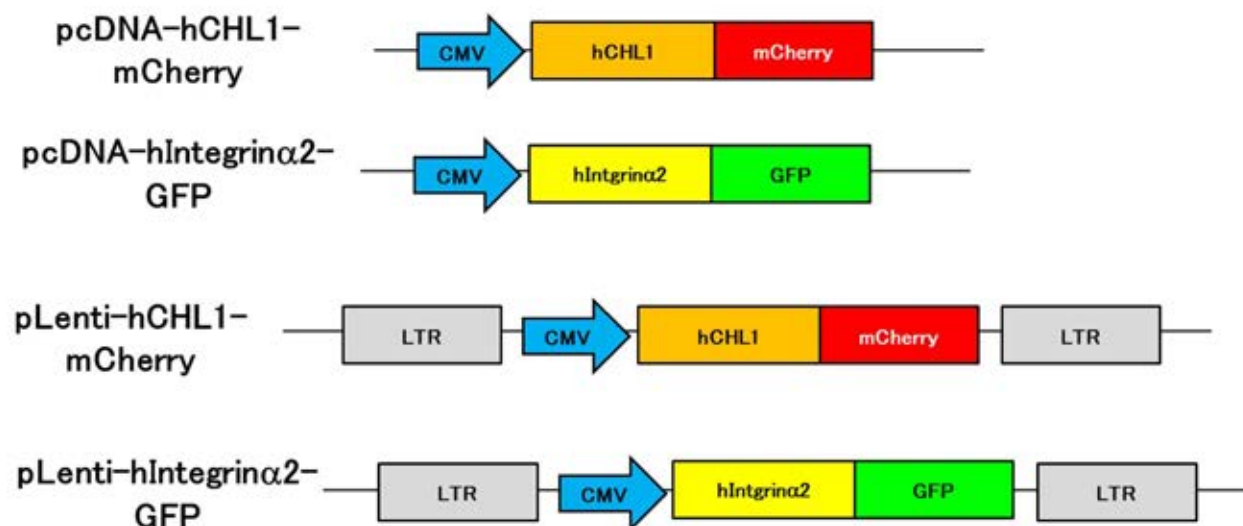
## <方法>

### 基本的な実験の流れ



### ① ベクター構築

まず、ハイブリドーマの作製を行うための CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 発現細胞株作製に使用する発現ベクター構築を実施した（下図参照）。



ブースト用細胞や PAI 細胞の作製が必要なので、通常の発現ベクター（pcDNA）に加え、レンチウイルスベクター（pLenti）も作製した。まず、CHL1 および  $\alpha 2$  integrin の完全長の cDNA をサブクローニングし、pcDNA には直接、pLenti には pENTR エントリーベクターを使用して挿入した。作製した各プラスミドを midiprep で増やし、各細胞に導入した。また、三重大学での DNA 免疫用のプラスミドに関しては（pcDNA-CHL1）、かなりの量が必要なので、maxiprep にて調製した。

さらに、PAI 細胞用にテトラサイクリン誘導型プロモーター Tet-On ベクターに CHL1-mcherry を導入したベクターも作製した。

### ② 各遺伝子導入細胞の作製

上記①で作製したベクターを用いて、

- ・免疫ブースト用 CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 発現細胞 (HEK293, CHO)
  - ・CHL1 発現ミエローマ (PAI)
  - ・CHL1 発現  $\alpha 2$  integrin 抗体ハイブリドーマ (P1E6)
- の各細胞の作製を試みた。

★免疫ブースト用 CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 発現細胞に関しては、以下のように作製した。

- ・CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 単独発現細胞

HEK293 に pcDNA-hCHL1-mcherry もしくは pcDNA- $\alpha 2$  integrin-GFP を Lipofectamine reagent を使用して遺伝子導入した。導入後に、zeocin で選択を行った。また、三重大学では、Transfection kit GenomONE-GX を使用して遺伝子導入した。

- ・CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 共発現細胞

pLenti- hCHL1-mcherry もしくは pLenti- $\alpha 2$  integrin-GFP と pPax2・pMD2.G をパッケージング細胞である HEK293 に導入し、培養 72 時間後にウイルス含有培地を回収した。まず、hCHL1-mcherry ウイルス培養液を直接細胞に処理し、puromycin で選択後 2 週間程度培養した細胞に、さらに  $\alpha 2$  integrin-GFP ウイルスを感染させた。

★CHL1 発現ミエローマおよび CHL1 発現  $\alpha 2$  integrin 抗体ハイブリドーマに関しては、以下の方法を実施した。

- ・pcDNA ベクターによる作製

pcDNA-hCHL1-mcherry もしくは pcDNA- $\alpha 2$  integrin-GFP をエレクトロポレーションで導入した。

- ・レンチウイルスベクターによる作製

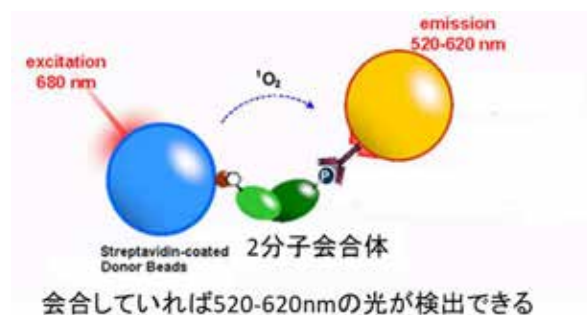
各細胞それぞれに、上記の CHL1-mcherry ウイルスを感染させた。

- ・テトラサイクリン誘導型プロモーターTet-On システムによる作製

Tet-On-CHL1-mcherry ベクターは、エレクトロポレーションおよび Transfection kit GenomONE-GX を用いて導入した。

### ③ 2 分子会合体発現細胞の検証法の開発

先行研究として、Perkinelmer 社の AlphaLISA システム (右図参照) で extracellular vesicle (EV) 上の相互作用を確認する手法の開発を行った。精製した EV に anti-hCHL1 抗体を作用させ、その後 AlphaLISA のドナービーズおよびアクセプタービーズを処理したのち、佐賀大学に送付し、専用の分析機器で解析を実施した。



#### ④ DNA 免疫および SST 法のための組換え細胞の作製

##### ・ CHL1 発現 CHO-K1 細胞

Transfection kit GenomONE-GX を使用して組換え細胞を作製し、限界希釈法によってクローン化した。

##### ・ CHL1 発現ミエローマ細胞 (PAI)

Transfection kit GenomONE-Neo を使用して組換え細胞を作製した（上記実験と同じものを三重大学でも作製した）。作製した CHL1 発現 CHO 細胞および CHO-K1 細胞を集め、PBS で洗浄後、マウス血清を加え、4℃で 1 時間ローテーションした。PBS で洗浄後、Alexa488 標識二次抗体を加え、4℃で 1 時間ローテーションした。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### ⑤ DNA 免疫

CHL1 をコードした pcDNA プラスミドをマウスの足部に注射し免疫化を行った（計 4 回）。ブーストには、上記で作製した CHL1 発現 CHO-K1 細胞を使用した（ $0.6 \times 10^7$  cells / 0.5mL in PBS）。

#### ⑥ 融合実験

DNA 免疫で作製した免疫マウスの脾臓と（組み換え効率は低い）CHL1 発現 PAI 細胞とのパイロット融合実験を実施した。様々な細胞数の組み合わせを試した。

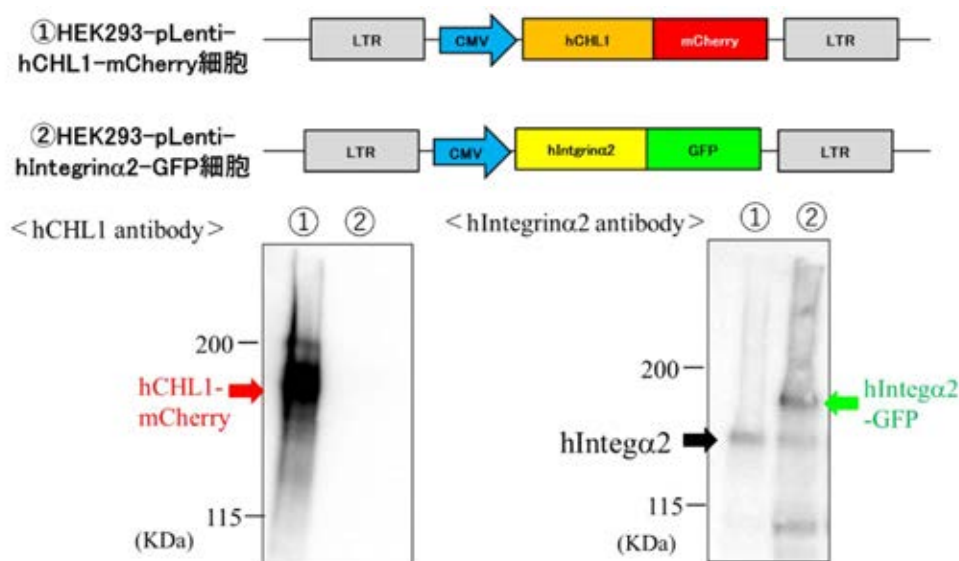
例）CHL1 発現 PAI 細胞  $1.8 \times 10^7$  cells（組み換え細胞を少量含む）と脾臓細胞  $7.7 \times 10^7$  cells を懸濁し、電気パルス融合を行った。

### III 研究成果

#### ベクター構築および各発現細胞の作製

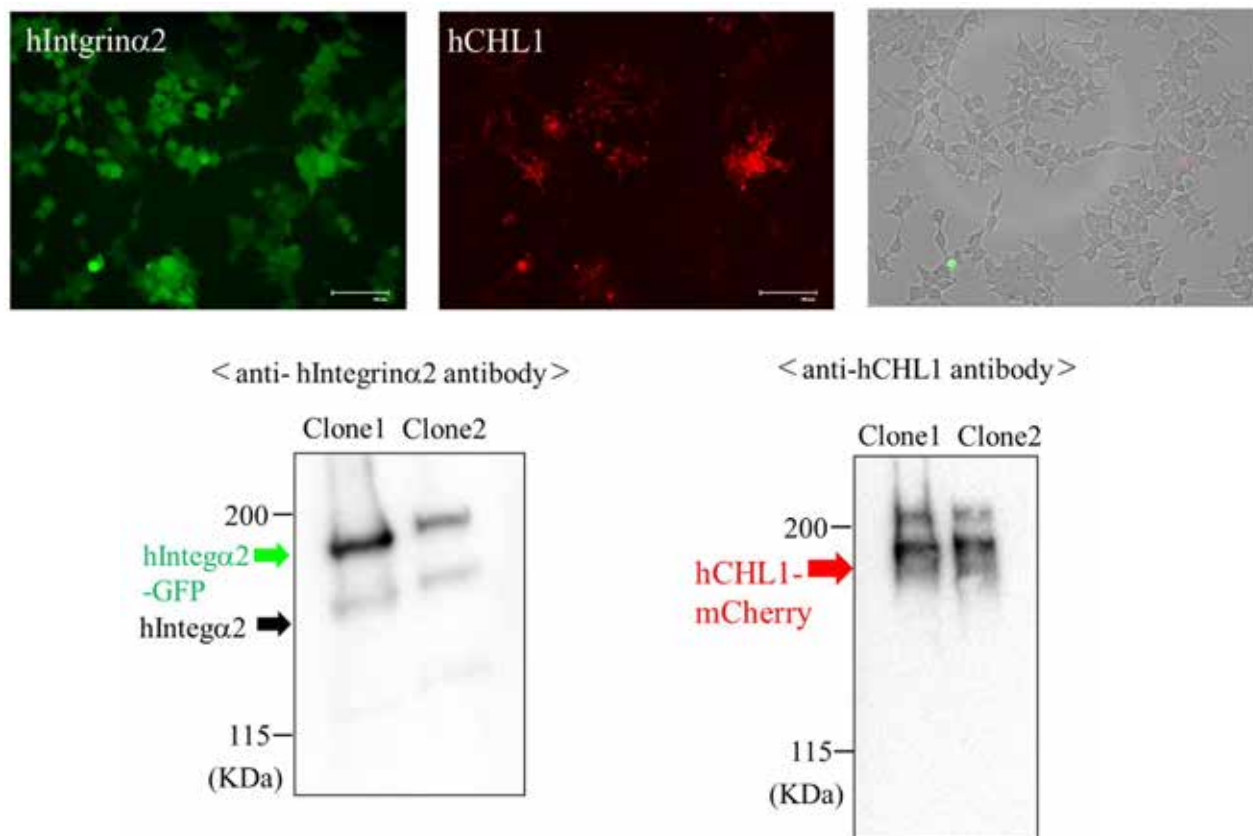
各ベクターを作製し、HEK293 にトランスフェクションもしくはウイルス感染させた。

例として、レンチウイルスによる HEK293 導入細胞のウェスタンブロットの結果を示す（下図参照）。





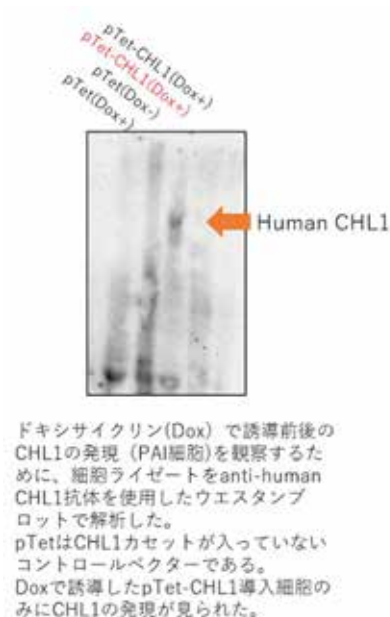
これらの結果より、作製したベクターはすべて CHL1 および  $\alpha 2$  integrin の発現ベクターとして使用できることが分かった。また、CHL1 および  $\alpha 2$  integrin の共発現細胞も作製した。当初、pcDNA -CHL1 での発現細胞を作製後、その細胞にレンチウイルスにて  $\alpha 2$  integrin を導入する予定であったが、うまくいかなかったため、CHL1 および  $\alpha 2$  integrin 両方ともレンチウイルスで発現させる細胞株を作製した。作製した細胞株の蛍光染色およびウェスタンブロットによる確認は以下のとおりである。



### 遺伝子組み換えミエローマの作製

三重大大学では、PAI ミエローマ細胞に一過性に CHL1 を発現させることができたが、効率が悪く、発現量が少ないために、埼玉医大で安定的な CHL1 発現 PAI ミエローマ細胞（および P1E6 ハイブリドーマ細胞）の樹立を検討することとなった。

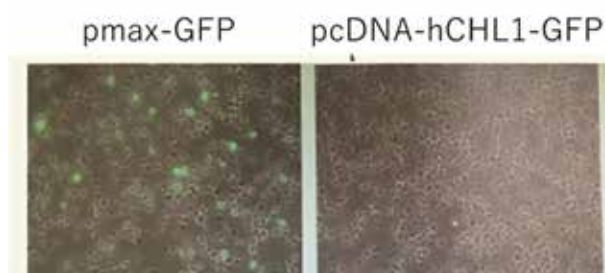
レンチウイルス発現系 (pLenti vector) を用いて PAI 細胞に発現を試みたが、低発現株が一時的に得られるものの、細胞が死滅した。そこで、レンチウイルスではないが、Tet-On 発現系 (タカラバイオ・クローンテック) を利用して PAI 細胞に発現誘導を試みた。パイロット実験では、ウェスタンブロット検出系では、テトラサイクリンによる発現誘導を認めた (右図)。しかし、継続培養した場合には、この発現は消えてしまうことが分かったため、P1E6 細胞も用いて、現在長期に発現させるための方策を検討中である。





また、TeT-on のプラスミドではなく、pcDNA-human CHL1 の発現ベクターに関して、電気穿孔法（エレクトロポレーション）を用いての遺伝子導入を新たに試みた。

過去に多くの実績がある Amaxa システム（Lonza）について、遺伝子導入が難しい細胞に有

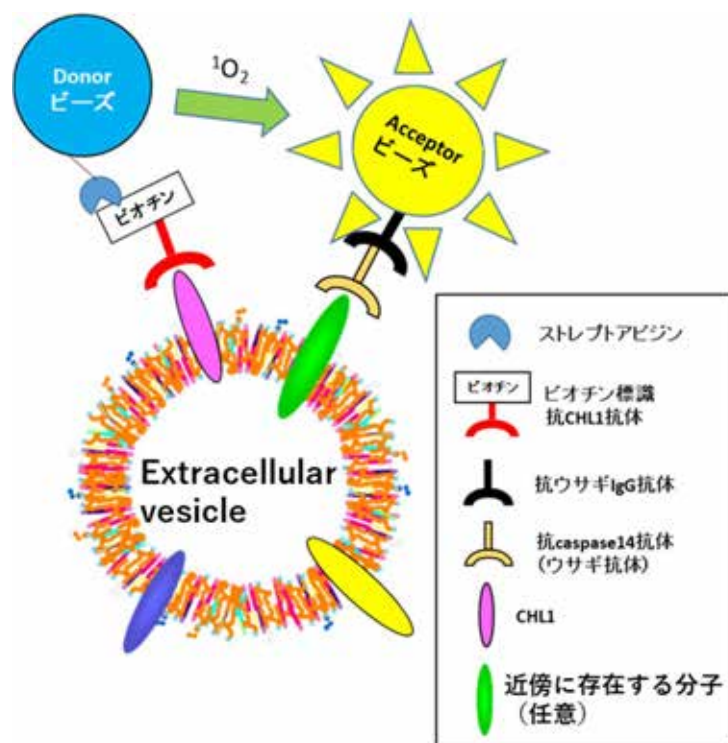


Amaxaシステムを使用したエレクトロポレーション法によるP1E6細胞への遺伝子導入。Pmax-GFPコントロールベクターでは多くの細胞に発現を認めたが、pcDNA-hCHL1ベクターでは発現が非常に少なかった。

効であるという情報を得たため、本システムを利用して導入を試みた。その結果、GFP を発現する pmax-GFP コントロールベクターでは、今までにない良好な導入効率を得たが、human CHL1 の発現ベクターではあまり良好ではなかった（左図参照）、導入する際の電気パルスの様式を検討している。

## 2 分子会合体発現細胞の検証法の開発

PerkinElmer 社の AlphaScreen（AlphaLISA）システムを使用して検討した。通常、分子間で使用されるシステムであるので、細胞での AlphaScreen（AlphaLISA）については、他の研究グループでもほとんど実施例がない。そこで、細胞より小さく、細胞の様態と類似している extracellular vesicle (EV) を利用して実験を開始した。AlphaScreen (AlphaLISA) システムは、2つの分子が近くに存在する場合、各分子に標識したドナービーズとアクセプタービーズと呼称する物質の距離が近くなり、一定の波長の光を照射すると、Donor ビーズから発生した一重項酸素がアクセプタービーズを励起して、特殊な波長の光を出すので、それを検出するシステムである。本研究では、右図のとおり、EV 上の CHL1 に結合できる anti-CHL1 抗体を選定し、EV 上の CHL1 に近接して存在する他の分子（以前の他の研究で把握済）を認識する抗体と共に使用した場合に、測定ができるかを検討した。

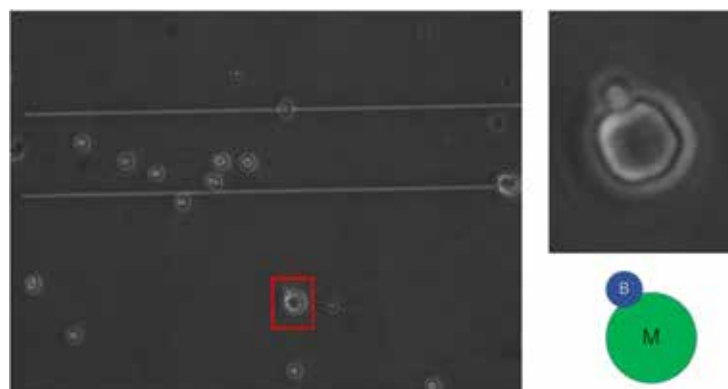


その結果、1) AlphaScreen システムは非特異的な反応が検出されることが分かり、AlphaLISA システムではそれがかなり少ないことから、AlphaLISA システムを使用する方がよい、2) CHL1 の抗体は ELISA で使用される抗体で利用できる可能性が高い、等の知見が得られた。抗体の組み合わせなども含めて、引き続き検討を行っている。

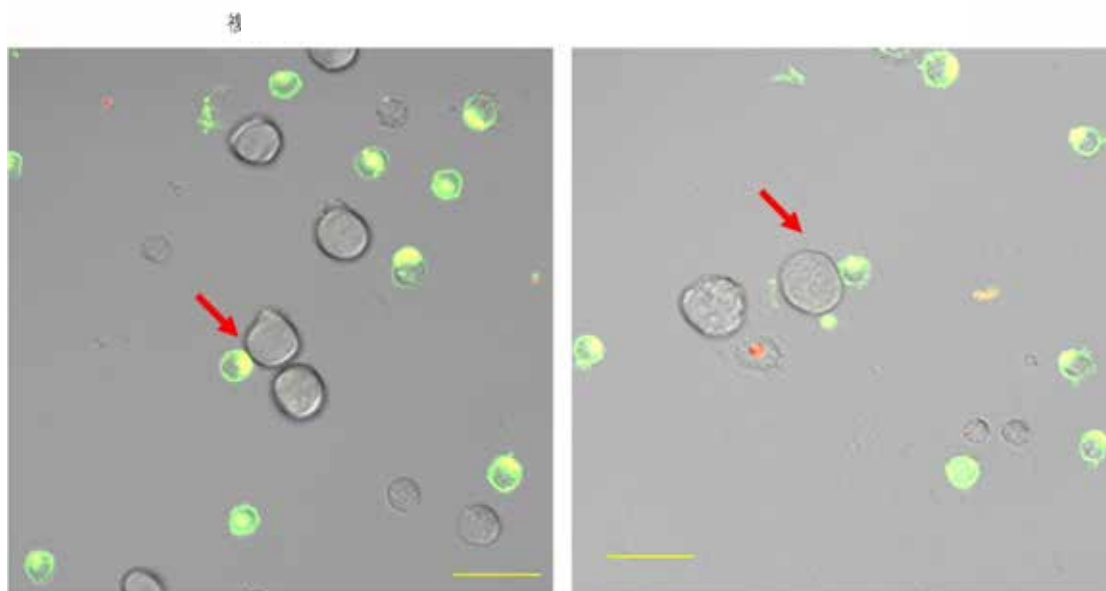
### DNA 免疫および立体構造特異的ターゲティング (SST) 法

BALB/c マウスで実施し、その心採血血清中の抗 CHL1 抗体価について CHL1 発現細胞を使用した Cell-ELISA 法で解析した。その結果、DNA 免疫したマウスにおいて抗 CHL1 抗体価の上昇が認められた。従って、免疫したマウス B 細胞の中に anti-CHL1 antibody を分泌するクローンが存在することが分かった。

そこで、CHL1 発現 PAI 細胞と要害マウス脾臓細胞を融合させて、96 穴プレートに播種したところ、下図のように一部に複合体らしき細胞群が確認された（下図参照）。

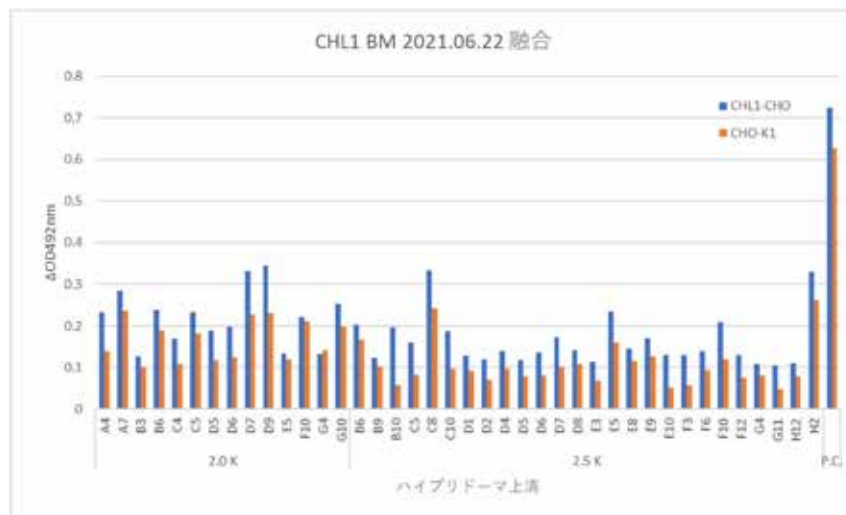


さらに、この脾臓細胞とミエローマ細胞の融合体について蛍光顕微鏡下で観察した（SST 法に基づき、接着細胞体形成後、Alexa488 標識抗マウス IgG (H+L) 抗体で B 細胞を染色し蛍光観察した：下図参照）。

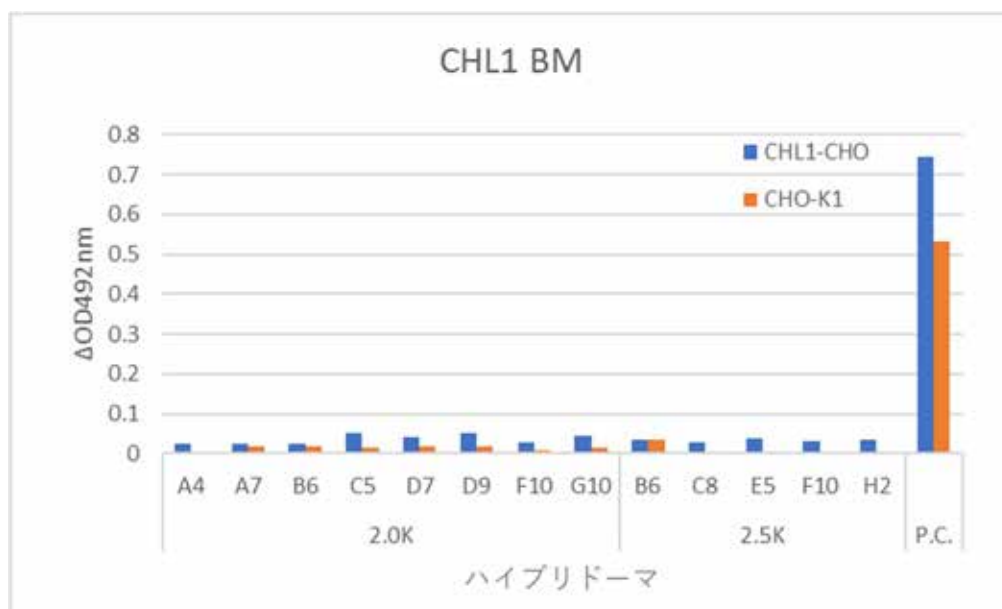


いくつかの接着細胞体を確認することができた。さらに、接着細胞体の B 細胞には Alexa488 由来の緑色蛍光が確認できた。

次に、クローン化したハイブリドーマの培養上清中の anti-CHL1 抗体量を Cell-ELISA 法によって評価した。CHL1-CHO 細胞が CHL1 を発現しているので、CHO-K1 細胞に比べて反応が高い上清のクローンが有用である（下図参照）。



複数の有用なハイブリドーマのクローンを確認でき、有用な株について再び Cell-ELISA 法によって評価したところ、こちらでもいくつかのハイブリドーマのクローンで抗体価を確認することが出来た（下図参照）。



ところが、24 穴プレートにスケールアップし、再度、抗体価を測定したところ、すべてのハイブリドーマで抗体価を確認することができなかった。

上記例のとおり、複数回 SST 法やパールチェーン法によって融合実験を行った。残念ながら、すべての融合実験でハイブリドーマを獲得することができなかった。

#### IV 考察

本研究において、2 分子会合体の抗体を作製することが最も重要かつ困難な課題であった。これまで、bispecific 抗体などは抗体医薬として開発がされていたが、細胞膜上の 2 分子会合体を認識するような抗体の開発は皆無であったためである。そこで、本研究では、三重大学大学院 工学研究科 富田 昌弘 教授および湊元 幹太教授に協力を仰ぎ、膜タンパク質に対する強力な結合抗体「立体構造認識スーパー抗体」の作製により諸

問題を解決することとした。これらの抗体を樹立する技術である「立体構造特異的ターゲティング（SST）法」はすでに多くの抗体の作製実績がある。従って、そのプロトコールに従い、DNA 免疫・抗原発現細胞によるブーストをかけたマウスを作製した。初期スクリーニングでは、抗体価が上昇していたため、目的の抗体を作製する B 細胞クローンは樹立できていると考えた。そこで、SST 法の根幹である抗原発現ミエローマと脾臓細胞（B 細胞クローン）の電気パルス融合を試みることにした。しかし、この抗原発現ミエローマ（CHL1 発現ミエローマ）の作製が非常に難しく、多くの時間と費用を費やした。原因は現在も不明であるが、発現が微弱であり、尚且つ、安定発現ができない事態が続いている。一部の一過性発現細胞を利用して、電気パルス融合を試みたが、残念ながら安定したハイブリドーマの樹立に至らなかった。CHL1 は本研究の肺がん細胞特異的 2 分子会合体の構成分子であるため、この立体構造認識スーパー抗体の取得は必須事項であったが、今後 EMARS で新しい分子のターゲットを見つけることも視野に入れる必要が生じた。

## V 研究成果の発表

現時点では、特になし



多次元テンソル情報から臨床予後の精緻な予測を可能とする  
革新的人工知能の開発研究



## 研究の概要

経験を積んだ臨床医は個別症例を特徴づける多次元情報に基づき、最適治療を選択している。多次元情報からの最適治療の選択は医師の直感による。ヒトの脳が多次元情報間の定量的相関関係の扱いに優れないため、直感による治療選択には客観性、再現性が乏しく科学性が低い。個体差を無視した患者集団を対象としたランダム化比較試験により確立された標準治療の科学性が高いとされる。コンピュータは簡単な四則演算しかできない。しかし、膨大な四則演算により多次元情報を定量的に扱うことが可能である。高速化した高性能コンピュータと情報工学技術により個別症例の多次元情報と未来の臨床イベント予後リスクの相関関係の定量化が可能となった。本研究ではニューラルネットワークの組み合わせを臨床データベースにて機械学習させ、個別症例の多次元情報から未来の臨床イベントリスクを予測する人工知能の作成を研究の目的とする。

人工知能の機械学習に用いる臨床データベースとして、1) 新規に診断された非弁膜症性心房細動に関する古国際共同研究データベース GARFIELD-AF、2) 胸痛のため心臓カテーテル検査を受け、経験を積んだ臨床医による動脈硬化性狭窄の有無のラベルのついた冠動脈造影動画の連続 200 例の臨床データベース、3) 介護を受けている高齢の介護施設入所者のうち 1-90 日の血圧計測値セットと 91-365 日の死亡の有無の情報、1-365 日の血圧の計測セットと 366-730 日の死亡の有無の情報のデータベース、を用いた。個別症例を特徴づける多次元情報としては GARFIELD-AF ではワルファリンの服用開始 1-30 日の PT-INR の経時的計測データセットを、冠動脈造影動画では 45 フレームの冠動脈造影動画を、高齢の介護施設入所者では 1-90 日および 1-365 日の血圧計測データセットを用いた。臨床予後としては GARFIELD-AF では 31-365 日の重篤な出血イベント、脳卒中・全身塞栓症および死亡イベントを用いた。冠動脈造影動画では専門医による動脈硬化性狭窄の有無を、介護施設入所者では 91-365 日ないし 365-730 日の死亡の有無を用いた。

高性能コンピュータとしては本研究資金にて購入した GPU 4 基を実装した HPC5000-XSLGPU4TS を用いた。畳み込みニューラルネットワーク (Convolution Neural Network: CNN) と再帰ニューラルネットワークの一種である Long Term Short Memory (LSTM) を組み合わせた。臨床データベースを人工知能導出用の derivation cohort、精緻化用の validation cohort、予測機能評価用の test cohort に分割した。Derivation cohort にて作成した人工知能の未来の臨床イベント予測性能を test cohort における実際のイベントの有無により検証した。検証には Receiver Operatorating Characteristic (ROC) 解析を用いた。予測精度の指標として Area Under the Curve (AUC) を用いた。

1-30 日の PT-INR の経時変化からの 31-365 日の重篤な出血イベント、脳卒中・全身塞栓症、死亡の予測精度は AUC 0.75 (95% CI, 0.62-0.87)、AUC 0.70 (95% CI, 0.56-0.83)、AUC 0.61 (95% CI, 0.54-0.67) であった。冠動脈造影動画による動脈硬化性狭窄の予測精度は AUC 0.61 であった。1-90 日の血圧から 91-365 日の死亡リスクを予測する AI-short、1-365 日の血圧から 366-730 日の死亡リスクを予測する AI-long の予測精度は AUC 0.58 (95%CI: 0.52-0.63) AUC 0.57 (95% CI: 0.51-0.63) であった。

多次元情報から個別例の臨床イベントリスクを予測する複数の人工知能を作成した。



## 共同研究者

足立 健 慶應義塾大学客員教授

佐野元昭 慶應義塾大学医学部・内科学教室（循環器内科）・准教授

長谷部光泉 東海大学医学部・基盤診療学系（画像診断学）・教授

横田秀夫 理化学研究所・チームリーダー

田村典子 新潟医療福祉大学・准教授

竹本智子 理化学研究所・研究員

坂野哲平 Allm Inc.・Group CEO

## 研究報告

### I. 研究目的

コンピュータの高性能化は、機械学習、人工知能の開発を可能とした。ヒトの神経細胞を真似たニューラルネットワークによる人工知能は、医療に革新的変化を起こす可能性がある。訓練された臨床医は個別の症例を特徴づける各種の多次元情報に基づいて個別最適医療を実践している。しかし、個別症例を特徴づける多次元情報と、個別症例の死亡、入院、各種疾病発症確率の相関関係の定量化はヒトの脳では実現できなかった。個別の臨床医の行う、直感に基づいた個別最適化医療には客観性、再現性が乏しく科学的でない。本

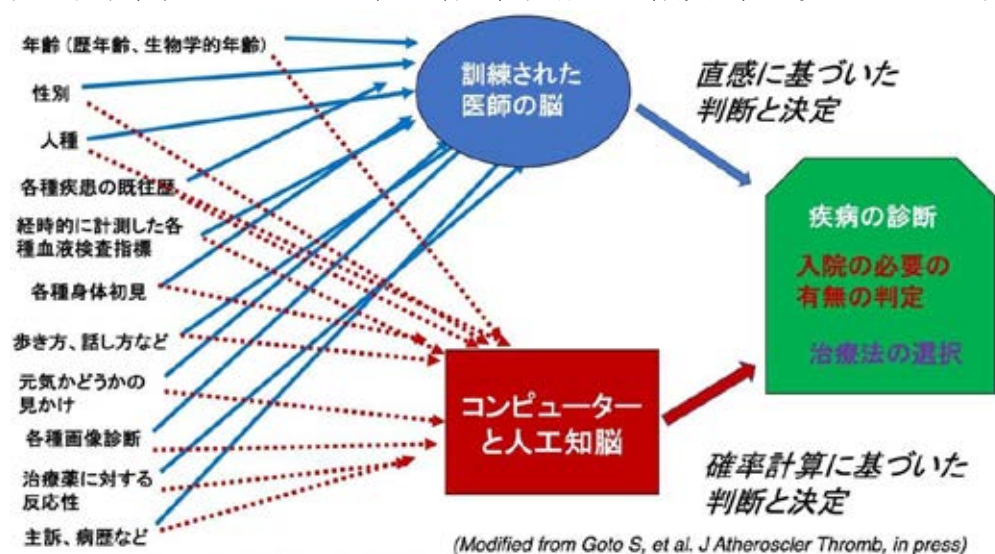


図1. 臨床医の直感的判断と人工知能。

を可能とする革新的人工知能の作成を目指す（図1）。

現在のコンピュータは単純な四則演算しかできない。直感に優れるヒトの脳を凌駕する人工知能の作成には成功していない。しかし、コンピュータは単純な四則演算の繰り返しにより多次元情報間の定量的相関関係の探索が可能である。本研究では、臨床現場にて使用される膨大な個別症例の多次元臨床情報と、個別症例における未来の死亡、入院、各種疾病発症リスクなどの1次元の臨床イベントリスクの相関関係の定量化をコンピューターと人工知能にて実現する。本研究では臨床現場にて臨床医が個別最適化医療において利用している個別症例を特徴づける多彩な多次元テンソル情報から個別症例の未来の臨床イベント発症リスクの定量予測を可能とする革新的人工知能の開発を本研究の目的とする。

### II. 研究計画および材料と方法

## 1. 研究計画

本研究では、個別症例の有する多次元情報と、個別症例の未来の死亡、重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症リスクなどの臨床イベントリスクの相関関係を定量化するための高性能コンピューターと各種人工知能作成のためのニューラルネットワークを初年度に整備する。整備した高性能コンピューターとニューラルネットワークに学習させるための各種臨床データベースを整備する。各年度に、整備した臨床データベースを用いて個別症例の多次元テンソル情報から、個別症例の死亡、重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症などの臨床イベント発症リスクの予測する革新的人工知能を作成し、作成した人工知能による未来の臨床イベントの予測性能を定量評価する。

## 2. 材料と方法

### 1) コンピューターと動作環境

臨床データベースを用いて多次元入力情報と未来の臨床イベントリスクの相関関係を定量化する計算を効率的に行うため GPU を実装した高性能コンピューターを初年度に整備する。具体的には GPU4 基を実装した HPC5000-XSLGPU4TS, (HPC systems Inc., Tokyo, Japan) を初年度に購入した。コンピューターの発熱対策として学内の大学院・代謝疾患研究センターに個室空調を整えたコンピューター室を整備した。連続稼働を可能とするために、コンピューターの動作状態を遠隔管理し、また申請者の大学院学生が on site の管理を行なった。本研究では、実在するヒトの臨床情報を扱うため、情報の管理は慎重に行なった。学内高性能コンピューターには個人を識別できる情報を削除して人工知能の作成、妥当性検証に必要な情報のみを導入した。さらに、コンピューターのメンテナンスも外部業者などに委託せず、医師免許を有するコンピューター技術者による遠隔管理と臨床情報管理の重要性を十分に教育した申請者の大学院学生により行なった。

### 2) 人工知能としてのニューラルネットワークの実装

研究開始前に、3 年間の研究期間内に作成する人工知能の標的を設定した。具体的に、ヒトの脳が定量関係を把握できない多次元情報として血液検査値、血圧などの時系列検査値、12 誘導心電図などの画像情報および冠動脈造影動画などの動画情報を用いることとした。また、これらの多次元情報との相関関係を解明する臨床予後イベントとしては、データベースの特性に応じて、未来の死亡、重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症、治療を要する冠動脈狭窄の有無などを用いた。ニューラルネットワークとしては畳み込みニューラルネットワーク (Convolution Neural Network: CNN) と、時間差の情報の扱いに優れる再帰ニューラルネットワークの一種である Long Term Short Memory (LSTM) の組み合わせを用いた。使用したニューラルネットワークの組み合わせについては発表論文上に公開した。

### 3) 人工知能の作成、精緻化、評価のための臨床データの準備

初年度にはコンピューター環境を整備した。多次元情報から個別将来の未来の臨床イベントを予測する人工知能の作成のために、研究代表者が研究推進委員を務める国際共同研究 GARFIELD (Global Anticoagulant Registry in the Field-Atrial Fibrillation) -AF のデータベースを用いた。2 年目、3 年目の研究のために必要な臨床データベースは各々研

究の前年度にデータベースの作成を行なった。人工知能の作成、予測機能の検証などの研究の対象範囲の拡大を目指して臨床データベースを用いた各種臨床的研究および血小板などを対象として基礎的研究をおこなった。1-3 年の人工知能開発研究に用いた主な臨床データベースは以下の通りである。

- a. 心房細動の脳卒中予防にワルファリン服用を開始した症例の PT-INR と未来の出血、死亡、脳卒中全身塞栓症の有無の情報を有する GARFIELD-AF のデータベース

GARFIELD-AF は世界 35 カ国から新規に発症した心房細動の症例を 5 万例以上登録した観察研究のコホートである。データベースは英国ロンドンの Thrombosis Research Institute (TRI) に集積されている。申請者は本研究の国際推進委員の一人として、本学にて PT-INR の経時変化から未来の臨床予後を予測する人工知能作成のために必要なデータベースの TRI から本学への移管を提案し、推進委員会の賛成を得た。ワルファリン服用開始 30 日以内の個別症例の PT-INR の経時変化および 31-365 日の重篤な出血、死亡、脳卒中・全身塞栓症の有無のラベル情報を本学に移管し、人工知能作成、精緻化、予測機能検証のためのデータベースとした。

- b. 冠動脈造影動画と治療を有する狭窄病変の有無のデータベース

狭心症などの診断には冠動脈造影動画が使用される。経験を積んだ臨床医は冠動脈造影動画から狭心症を起こす冠動脈の動脈硬化性狭窄の有無を判定している。そこで、連続 200 例の冠動脈造影動画と、本研究に関わらない循環器専門医による冠動脈・動脈硬化性狭窄の有無のラベル情報を集積した。動脈硬化性狭窄があるとされた症例は 1 ヶ月以内に冠動脈形成術などを受けることになる。本研究では、冠動脈造影動画の入力から動脈硬化性狭窄の有無を判定する人工知能であるが、実態としては 1 ヶ月以内の冠動脈形成術の要否を判定する人工知能を作成することになる。

- c. 血圧の経時計測から未来の死亡リスクを予測する人工知能のためのデータベース

血圧は広く使用されている健康指標である。単回の血圧計測値であっても未来の心血管疾患の発症リスクの規定因子である。単純な血圧であっても経時計測した値のセットは多次元情報である。Allm 社が管理している介護を受けている高齢の健常者約 10 万人から、1-90 日の血圧計測値セットと 91-365 日の死亡の有無の情報、1-365 日の血圧の計測セットと 366-730 日の死亡の有無の情報だけを抜き出して本学のコンピューター上に移植し、血圧の経時計測値から未来の死亡の有無を予測する人工知能作成のためのデータベースとした。

#### 4) 人工知能の作成、精緻化、予測機能の評価

a. の GARFIELD-AF のデータベースの作成にあたって、毎年 1 万例ずつ 5 年にわたって症例を集積した。そこで、最初の 3 年のコホートを人工知能作成のための derivation cohort、残りの 2 年に集積された症例を人工知能の予測機能評価のための validation cohort とした。b. c のデータベースから人工知能作成のための derivation cohort をランダムに選択した。残りの症例から人工知能を精緻化する validation cohort をランダムに選択した。さらに、残りの症例を人工知能の予測精度を検証する test cohort とした。test cohort にて予測精度を検証した。

GARFIELD-AF を用いた人工知能作成の実際を図 2 に示す。A. に示すニューラルネットワー

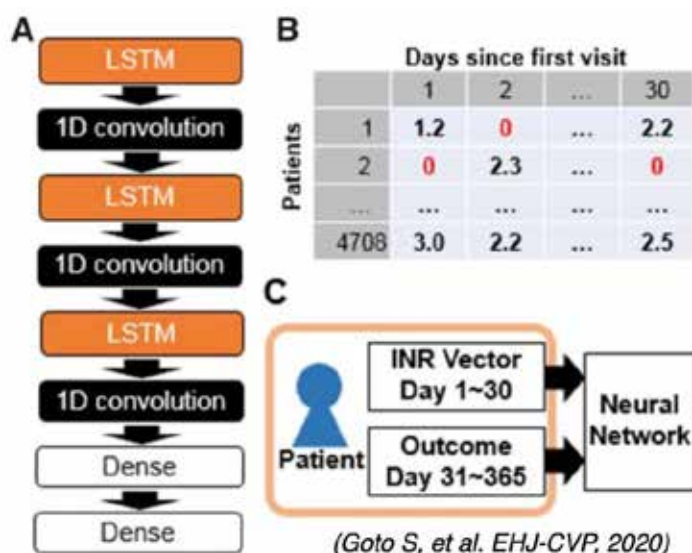


図2. 人工知能作成に用いたニューラルネットワークと学習の実例

の定量性を理解できない。そこで、作成した人工知能の予測精度の検証には test cohort を用いて Receiver Operatorating Characteristic (ROC) 解析を行なった。すなわち、test cohort の個別症例について、多次元情報から予測された臨床イベント発症リスクと実際のイベント発症の有無の感度・特異度を 2 次元面にて解析した。ROC 曲線以下の部分 Area Under the Curve (AUC) を予測機能の定量指標として各人工知能について計算した。サンプルサイズが十分に大きかった a. および c. ではブートラップ法にて AUC の 95% 信頼区間を算出した。

### III. 研究成果

方法に記載した 3 つの臨床データベースを用いて、個別症例の多次元情報から未来の臨床イベントの定量予測を可能とする革新的人工知能を作成した。

a. 心房細動の診断時に脳卒中予防にワルファリン服用を開始された症例の 30 日以内の PT-INR の経時変化から未来の重篤な出血、死亡、脳卒中・全身塞栓症の予測

GARFIELD-AF には 5 万人以上の症例が登録されていた。新規にワルファリンの服用を介した症例は 14, 437 例であった。PT-INR はワルファリンの薬効指標として広く使用される。一般に PT-INR が低ければワルファリンを増量し、PT-INR の値が高ければワルファリン減量がなされる。臨床医は経時変化が予後と関連することを直感的に理解していた。しかし、時系列の PT-INR の計測値セットと臨床イベント発症リスクの間の定量的相関関係の解明に至っていなかった。時系列の PT-INR の計測情報セットを 1 次元の値に変換する方法として、PT-INR が過去の一定期間において標的範囲に入っていた時間の比率 Time in Therapeutic Range (TTR) が用いられてきた。TTR は、ワルファリンと他の薬の有効性・安全性の比較を行う際に、TTR が 65% 以上であればワルファリン群における PT-INR の管理は妥当であった、などの指標として用いられてきた。TTR 単独では個別症例の未来予後の予測に用いられることはなかった。本研究では、われわれが開発する人工知能の予測精度との比較に用いる過去の方法として TTR を利用した。TTR を算出するためには設定期間以内

クの組み合わせに、B. に示す個別症例の 30 日以内の毎日の PT-INR の計測データセットと C. に示す 31-365 日の重篤な出血イベント、脳卒中・全身塞栓症、死亡の有無の関係を学習させた。

冠動脈造影動画、血圧の経時計測を用いた研究でも図 2 と同様にして多次元の入力情報と未来の予後イベントの発症リスクを学習させて人工知能を作成した、ヒトの脳は作成された多次元情報を含む相関関係

に PT-INR が 3 回以上計測されている必要がある。そこで、30 日以内に PT-INR が 3 回以上計測されている症例 4,708 例を本研究の対象とした。3185 例を人工知能作成のための derivation cohort、1523 例を作成する人工知能の予測精度検証のための validation cohort とした。

1-30 日の PT-INR の経時的変化と 31-365 日の重篤な出血イベント、脳卒中・全身塞栓症、死亡の有無の情報を学習させて未来の臨床イベントリスクを予測する人工知能を作成した。われわれの作成した人工知能による未来の臨床イベント発症予測の精度を図 3A に示した。重篤な出血イベントの予測精度は AUC 0.75 (95% CI, 0.62-0.87) であった。従来の標準的方法であった TTR の重篤な出血イベント発症リスク予測精度が AUC 0.47 (95% CI,

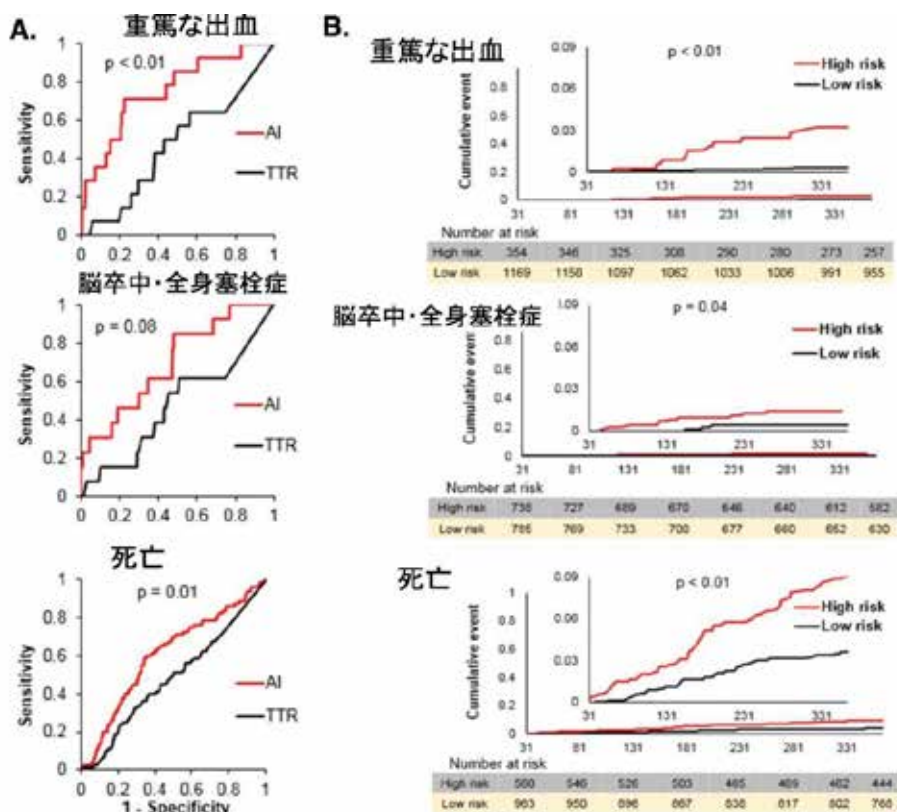


図3. 作成した人工知能の予測性能評価

0.61 (95% CI, 0.54-0.67) と従来法の TTR の AUC 0.48 (95% CI, 0.42-0.54) に優った。

重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症、死亡を予測する人工知能による未来イベントの予測精度、感度、特異度は、重篤な出血にて精度 0.78 (0.40-0.92)、感度 0.79 (0.50-1.00)、特異度 0.78 (0.39-0.93) であった。脳卒中・全身塞栓症の予測精度は 0.53 (0.24-0.98)、感度は 0.85 (0.31-1.00)、特異度は 0.53 (0.23-0.99) であった。死亡の予測精度は 0.64 (0.51-0.69)、感度は 0.63 (0.50-0.76)、特異度は 0.65 (0.50-0.70) であった。

予測精度が最大となる条件においてイベントリスクの高い症例と低い症例に弁別した(図 3B)。重篤な出血は、未来にほぼイベントが起こらない 1169 例とイベントリスクの高い 354 例に弁別できた。脳卒中・全身塞栓症ではリスクの低い 785 例とリスクの高い 738 例に弁別できた。死亡はリスクの低い 963 例とリスクの高い 560 例に弁別できた。

#### b. 冠動脈造影動画を用いた循環器専門医による冠動脈・動脈硬化狭窄の有無の予測

右・左の冠動脈の病変の有無の判定のために症例に応じて各種の方向から冠動脈造影動



画が取得される。本研究では 199 例から取得した 1,838 個の冠動脈造影動画を人工知能訓練用の 109 例・989 ビデオ、精緻化用の 37 例・378 ビデオ、予測機能評価用の 53 例・479 ビデオに分けた。入力情報は冠動脈造影ビデオを構成する各フレームの各ピクセルの 256 階調の濃度(D):  $(T_{nk}, Y_{ni}, X_{nj})$ とした。冠動脈造影動画にて 75%以上の動脈硬化性病変があると循環器の専門医により判定されると一般にカテーテルによる冠動脈形成術(percutaneous coronary intervention: PCI)が施行される。本研究結果は、冠動脈造影動画による 1 ヶ月以内の PCI 必要症例の予測精度は AUC 0.61であることを示した。

c. 日本の介護施設入所中の健常高齢者の経時的血圧計測による未来の死亡リスクの予測

日本の介護施設入所中の高齢の健常者を対象として 1-90 日の血圧により 91-365 日の死亡リスクを予測する AI-short と 1-365 日の血圧から 366-730 日の死亡リスクを予測する AI-long を作成した。AI-short 作成用の 40,055 例のうち 340 例が 91-365 日に死亡した。また、AI-long 作成用の 19,740 例のうち、265 例が 366-730 日に死亡した。91-365 日に死亡した 340 例の 1-90 日の血圧  $117.8 \pm 0.5$  mm Hg (平均 $\pm$ 95%信頼区間)は、非死亡例の血圧  $123.6 \pm 0.1$  mm Hg (平均 $\pm$ 95%信頼区間)よりも低かった。366-730 日に死亡した 265 例の血圧  $119.76 \pm 0.28$  mm Hg (平均 $\pm$ 95%信頼区間)は非死亡例の  $123.64 \pm 0.1$  (平均 $\pm$ 95%信頼区間) mm Hg よりも低かった。

1-90 日の血圧の経時変化から 91-365 日の死亡を予測する人工知能の予測精度は AUC 0.58 (95%CI: 0.52-0.63)であった。1-365 日の血圧から 366-730 日の死亡を予測する人工知能の予測精度は AUC 0.57 (95% CI: 0.51-0.63)であった。

#### IV. 考察

医療現場では個別の症例を特徴づける多くの多次元情報が個別症例の疾病の診断、治療方針の決定、予後の予測に利用されている。本研究では臨床現場にて広く使用されている血液検査指標、動画、血圧などを多次元の時系列情報として、個別症例において未来の重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症、死亡、1 ヶ月以内の冠動脈 PCI の要否などの臨床イベントリスクとの相関関係を定量化する人工知能を作成した。抗凝固薬ワルファリン服用後 1-30 日以内の PT-INR の経時的変化の情報には 31-365 日の重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症、死亡イベントの発症予測に寄与する情報が含まれていた。特に、将来の重篤な出血イベントの予測精度は高かった。さらに、作成した人工知能の出力に基づいて、1-30 日の PT-INR の経時的計測値セットにより、31-365 日に重篤な出血イベントを起こす可能性のある 3 割の high risk 症例と出血イベントリスクがほぼ 0 となる 7 割の low risk 症例の弁別が可能であった。従来の臨床医学の論理では、患者集団を対象としたランダム化比較試験により平均的症例の標準治療を一律に転換していた。人工知能の利用により、従来治療では重篤な出血イベントなどの未来の臨床イベントリスクの高い少数例を精度高く弁別できることが示唆された。具体的実例を示すと、従来の医学の論理では、非弁膜症性心房細動を対象としたランダム化比較試験にて、安価な標準治療であるワルファリンに対する有効性・安全性が検証された場合、全ての非弁膜症性心房細動の脳卒中予防治療が高価な新薬に転換されるとの問題があった。本研究では、安価な従来の標準治療では未来の臨床イベントリスクの高い少数例を弁別し、その少数例に高価な薬剤を用いることにより医療コストの

削減を実現できる可能性が示唆された。

冠動脈造影動画は、冠動脈の動脈硬化性狭窄の有無の判定に広く用いられている。動画の各フレームには狭窄の有無を判定する決定的情報を有していない。動画とすることにより経験を積んだ臨床医が直感的に狭窄の有無を判定している。冠動脈造影動画と専門医の動脈硬化性狭窄有無の判定のラベルを人工知能により学習することにより、冠動脈造影動画が動脈硬化性狭窄の有無の判定にかかわる情報を保有していることを本研究にて示すことができた。冠動脈に動脈硬化性狭窄があると、その狭窄部位に対して経皮的冠動脈形成術（percutaneous coronary intervention: PCI）が施行される。われわれの研究は、人工知能により冠動脈造影動画から未来の PCI の要否の判定に寄与する情報を取得できることを示した。予測精度が AUC0.61 と低いので、冠動脈造影動画といえども未来の PCI の要否に関する完全な情報を有しているわけではないことも示唆された。

血圧は日常的に計測される健康・疾病指標である。一度の計測であっても、高血圧の症例では将来の心血管イベントが高いと報告されている。過去の研究により、経時的に計測した血圧値の変動の大きい症例の予後が悪いことが示されている。臨床医も、直感的に 1 時点の血圧計測よりも複数回の血圧の計測値セットが未来イベントと関連する情報を多く有していると直感している。本研究では日本の高齢者のうち、介護施設に入所中の症例を対象とした。10 万例以上の対象症例から、1-90 日、1-365 日の血圧の経時計測値と 91-365 日、366-730 日の死亡の有無のラベル情報を有する症例を選択し、1-90 日の血圧計測値セットから 91-365 日の死亡の有無を予測する AI-short および 1-365 日の血圧計測値セットから 366-730 日の死亡を予測する AI-long を作成した。AI-short, AI-long とともに、未来の死亡の予測に寄与する因子を含んでいることを示した。

PT-INR の 30 日以内の計測値の時系列情報、冠動脈造影動画、1-90 日および 1-365 日の血圧の経時計測値セットなどの多次元情報から、未来の死亡、重篤な出血、脳卒中・全身塞栓症の発症リスク、PCI の要否などを定量予測する人工知能の開発に成功した。本研究の方法は各種のバイオマーカーなどの時系列の計測情報、静止画および動画情報などの多次元情報と未来の死亡、重篤な出血などの臨床イベント発症リスクの定量関係の解明に応用可能である。本研究は、経験を積んだ臨床医が直感により把握していた個別症例の多次元情報と未来の臨床イベント発症リスクの定量的相関関係を、コンピューターと人工知能が定量化できることを示した。大規模な臨床データベースを用いた研究では、人工知能による予測が過去の標準的方法などよりも優れた予測精度を有することを統計学的に示した。冠動脈造影動画を用いた研究は、多次元情報としてはもっとも複雑な情報であったが症例数が 200 例と少なかったため予測精度の妥当性を統計学的に検証することができなかった。コンピューターと人工知能は、個別症例を特徴づける多次元情報と予後イベントリスクの定量的相関関係を見出す能力がある。しかし、検出した定量的相関関係の精度の検証には大規模な臨床データベースが必須であることが示された。

本研究では高性能コンピューターとニューラルネットワークを、個別の症例を特徴づける多次元の入力情報と、個別の症例の 1 次元の臨床イベントリスクの定量的相関関係を見出すツールとして利用した。実際に検出された定量的相関関係を電子カルテシステムなどに実装すれば、実臨床における個別症例の予後予測も可能となる。しかし、本研究にて用いた各種の多次元入力情報による個別症例の予後予測の精度は最も高い 1-30 日の PT-INR

による 31-365 日の重篤な出血イベントの予測精度であっても精度 0.78 (0.40-0.92)、感度 0.79 (0.50-1.00)、特異度 0.78 (0.39-0.93) に止まった。さらに、本研究により作成された人工知能の予測精度は、モデル作成に用いたコホートと全く別のコホートにおいては検証されていない。本研究にて作成した人工知能などを電子カルテシステムなどに実装し、実際の臨床に使用できる精度に向上させるまでの精度の保証にまで本研究では至っていない。今度、データベースを拡張し、人工知能作成用のデータベースとは異なるデータベースでの妥当性検証などが必須である。

本研究では個別の症例を特徴づける多次元情報と、個別の症例の未来の臨床イベントリスクの関係を定量化する人工知能の作成に成功した。データベースを拡大して人工知能を精緻化し、臨床応用に向けて発展させる必要がある。

## V. 研究成果の発表

1. Goto S, Goto S. Application of Neural Networks to 12-Lead Electrocardiography – Current Status and Future Directions. *Circ Rep.* 2019 Nov 2;1(11):481-486. doi: 10.1253/circrep.CR-19-0096.
2. Ayabe K, Goto S, Oka H, Yabushita H, Nakayama M, Tomita A, Hasebe T, Yokota H, Takagi S, Goto S. Potential different impact of inhibition of thrombin function and thrombin generation rate for the growth of thrombi formed at site of endothelial injury under blood flow condition. *Thromb Res.* 2019 Jul;179:121-127. doi: 10.1016/j.thromres.2019.05.007
3. Goto S. Global Trial or Local One? *Circulation.* 2019 Dec 3;140(23):1878-1880. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043629.
4. Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, Gibson CM, Goto S, Katus HA, Kerneis M, Kimura T, Kunadian V, Pinto DS, Shiomi H, Spertus JA, Steg PG, Mehran R. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Jun 6;5(1):39. doi: 10.1038/s41572-019-0090-3.
5. Goto S, Oka H, Ayabe K, Yabushita H, Nakayama M, Hasebe T, Yokota H, Takagi S, Sano M, Tomita A, Goto S. Prediction of binding characteristics between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib $\alpha$  with various mutations by molecular dynamic simulation. *Thromb Res.* 2019 Dec;184:129-135. doi: 10.1016/j.thromres.2019.10.022
6. Goto S, Goto S, Pieper KS, Bassand JP, Camm AJ, Fitzmaurice DA, Goldhaber SZ, Haas S, Parkhomenko A, Oto A, Misselwitz F, Turpie AGG, Verheugt FWA, Fox KAA, Gersh BJ, Kakkar AK. New artificial intelligence prediction model using serial prothrombin time international normalized ratio measurements in atrial fibrillation patients on vitamin K antagonists: GARFIELD-AF. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2020 Sep 1;6(5):301-309. doi: 10.1093/ehjcvp/pvz076.
7. Goto S and Goto S. Is the answer to clinical questions provided by Bayesian network meta-analysis? Regarding the optimal duration of DAPT and the best subsequent SAPT. *EHJ-CVP,* 2020 in press



(<https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvaa032>)

8. Goto S. Mechanism of Thrombus Formation in Regard to Diet. In “New Insights Into Metabolic Syndrome” eds by Takada A, et al. DOI: 10.5772/intechopen.92382, IntechOpen, London (UK), 2020
9. Yabushita H, Goto S, Nakamura S, Oka H, Nakayama M, Goto S. Development of Novel Artificial Intelligence to Detect the Presence of Clinically Meaningful Coronary Atherosclerotic Stenosis in Major Branch from Coronary Angiography Video. J Atheroscler Thromb. 2021 Aug 1;28(8):835-843. doi: 10.5551/jat.59675.
10. Tamura N, Shimizu K, Shiozaki S, Sugiyama K, Nakayama M, Goto S, Takagi S, Goto S. Important Regulatory Roles of Erythrocytes in Platelet Adhesion to the von Willebrand Factor on the Wall under Blood Flow Conditions. Thromb Haemost. 2021 Oct 25. doi: 10.1055/a-1677-9499.
11. Goto S, McGuire DK, and Goto S. The Future Role of High-Performance Computing in Cardiovascular Medicine and Science -Impact of Multi-Dimensional Data Analysis. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2021 Vol. advpub DOI: 10.5551/jat.RV17062
12. Tamura N, Goto S, Yokota H, and Goto S. “Contributing Role of Mitochondrial Energy Metabolism on Platelet Adhesion, Activation and Thrombus Formation under Blood Flow Conditions.” Platelets: 1-7. DOI: 10.1080/09537104.2022.2046722
13. Kato E, Goto S. The TIMI Study Group’s Contributions to the Advancement of Cardiology -With Focus on Atherosclerotic Cardiovascular Disease-. J Atheroscler Thromb, 28(6):563-572 2021
14. Nakayama M, Goto S, Sakano T, and Goto S. Detection of the Quantitative Relationship between the Multi-dimensional Data Sets of Serially Measured Blood Pressure and the Future Risk of Death in Healthy Elderly Japanese Population. J Atheroscler Thromb, submitting

[禁無断転載]

令和4年12月発行

がん・心臓病の基礎的、先駆的研究事業報告書

発 行 公益財団法人車両競技公益資金記念財団

東京都文京区本郷 3-22-5

住友不動産本郷ビル 8 階

電話 03-5844-3070(代表) <http://www.vecof.or.jp/>

発行者 田宮 治雄

印 刷 (株)サンワ

印刷 4.12.200

