

—特集 [形態学の逆襲：形態学教室の扉をたたいてみてください (3)]—



オミクス解析を用いたバイオマーカー開発から 空間的分子解析による形態理解へ

石野 孔祐 大橋 隆治

日本医科大学統御機構診断病理学

1. はじめに

バイオマーカーとは、『通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性』をいう¹。血液検査、腫瘍マーカーなどの検査値や、DNA、RNA、蛋白質、ペプチド、画像診断データなどが含まれる。種類としては、疾患の診断に用いるための診断マーカー、治療効果を予測する予測マーカーなどに分けられ、用途によって使い分けられている² (図1)。医療では様々な場面でバイオマーカーが用いられており、バイオマーカーは診断、治療、薬剤開発に役立てられている。

2000年代初頭から生体分子を網羅的に解析できる技術であるオミクス解析が行われてきた。オミクス解析とは、生体分子を対象とする網羅的解析の総称で、対象とする生体分子によって手技が異なる。すべての生体分子を大規模に解析してその結果を俯瞰することにより、既存の知見や理論では紡ぎ出せなかったであろう新たな特徴を得るといった試みも行われる。そういった特徴からオミクス解析はバイオマーカー開発と相性が良い。

本稿では、オミクス解析におけるバイオマーカーの検索および利活用と、オミクス解析を用いた形態理解に資する技術進展について紹介する。

2. バイオマーカーの診療における必要性和今後

バイオマーカーは現代の医療に欠かせない指標であり、患者の疾患同定、薬剤効果のモニタリング、疾患の病勢判定の際に診断補助として使われている。個々のバイオマーカーの例としては2型糖尿病を診断するマーカーである血中HbA1cや劣性遺伝性疾患の新生児タンデムマススクリーニング、健康診断での生化学検査やがん検診が挙げられる。

病理診断の役割は疾患の最終診断であり、治療方針の決定、治療効果の判定、患者の予後判定などが含ま

れる。診断は手術標本のHematoxylin Eosin染色における光学顕微鏡下での形態解析を主とし、時に疾患特異的なバイオマーカーの免疫染色像を参考に鑑別診断を行うことでより正確な診断を行う。近年では病理医は、特定のがん腫で特定のバイオマーカーの有無に基づき、対応する医薬品の適用を判定するコンパニオン診断 (Companion Diagnostics : CDx) において重要な役割を担う。

バイオマーカー検査の最近の例として、2019年より保険収載されたがん診療におけるがん遺伝子パネル検査が挙げられる。これは次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer ; NGS) を利用して既知の体細胞変異のうち最大でおよそ400種類の変異を一度に調べる検査をいう。包括的ゲノムプロファイリング (Comprehensive Genomic Profiling : CGP) を運用の基本としており、すなわち標準治療の標的遺伝子変異も含めた約400の遺伝子変化を網羅的に解析し、結果を専門家が統合・解釈し治療方針の決定を補助するのが本邦のがん遺伝子パネル検査である。これらの情報は唯一無二であり、倫理面を適切に保護した上でがんゲノム情報管理センター (Center for Cancer genomics and Advanced Therapeutics : C-CAT) にかん遺伝子パネル検査を実施する全国233施設の約4万人分 (2022年8月時点) の情報が集約され、世界に類を見ないデータベースとして整備されている³。C-CATは診療検索ポータル、利活用検索ポータルという二つのポータルサイトを通じて、集積されたデータの利活用を進めている。詳細はプレスリリース資料を参照願いたい (https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2022/1104/20221104C-CAT.pdf)。ホームページを通じて簡易の情報公開もなされている (<https://for-patients.c-cat.ncc.go.jp/library/statistics/>)。バイオマーカーは現代医療で無くてはならないものであり、今後開発されるバイオマーカーについても更なる有効な活用法が展開されていくものと期待される。

診断マーカー：疾患の有無、分類の補助
モニタリングマーカー：疾患の状態や治療への反応をみる
応答マーカー：薬剤への応答レベルを評価する
予測マーカー：特定の治療による効果を検知する
予後マーカー：疾患の進行、再発を予測する
代替エンドポイントマーカー：薬剤の効果を効率的に判定する
安全性マーカー：薬剤の毒性発現を検知する
感受性・リスクマーカー：疾患の発生を予測する

図1 バイオマーカーの機能による分類

3. オミクス解析の種類とバイオマーカーとしての利用

オミクス解析は、かつては機器も高額で技術も特殊であるため臨床医学の研究者が導入するには敷居の高い手法であった。近年では多くの大学にNGSや質量分析装置が導入されているのに加え、外部委託でも比較的安価にオミクス解析を導入できる状況になってきた。以下に代表的なオミクス解析を概説する。

ゲノミクス

2003年に日本も共同参画した国際プロジェクトによってヒトゲノムの塩基配列が報告され、ゲノム多様性と遺伝性疾患の関係性が理解されてきた。2010年代にはNGSによる高速ゲノム解析が研究室レベルで可能となり、多くの遺伝性疾患やがん患者一人一人のがんゲノムが解読された。現在では米国のThe Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトやThe Catalogue of Somatic Mutation in Cancer (COSMIC) などが無料で利用できるデータベース (DB) としてこれらのデータを整備している。また、一般の日本人5万人分のNGS解析結果をまとめた日本人ゲノムの雛形となる日本人基準ゲノム配列DBも東北メディカル・メガバンク機構 (TMM) により整備されている。

トランスクリプトミクス

1990年代にDNA chipが開発され、一度の分析で25,000種類前後のmRNA量を網羅的に調べられるようになった⁴。トランスクリプトミクスはmRNAを網羅的に解析する手法で、今ではNGSを用いたRNA-sequencing (RNA-seq) は安価なものでは4万円/検体程度の価格で約2万遺伝子の受託解析が可能である。RNA-seqの検体の種類は、各受託会社のオプションにもよるが、細胞株や凍結組織、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織、液状検体から採取した細胞などが一般的である。トランスクリプトミク

スはその感度の高さから様々な検体を用いた解析に利用されている。DBも整備されており、TCGA, gene expression omnibus (GEO)をはじめ、限られたがん種 (肺がん, 卵巣がん, 乳がん, 胃がん) だけだが各遺伝子発現が予後に与える影響を Kaplan-Meier 曲線で表示できるウェブサイトも知られる (KM-plotter, <http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=ovar>)⁵。

プロテオミクス

プロテオミクスとは蛋白質を網羅的に解析する方法で、2000年代初頭から質量分析装置を所有する大学・研究所および民間企業の研究者らによって実施されてきた。現在では質量分析装置の分析速度および感度の向上の恩恵を受け、トリプシン消化などの全工程をサンプル溶液内で処理したのち質量分析装置に供することで、一度に1,000個以上の蛋白質を同定できるシステムが確立されている。サンプル間の量比は、あらかじめサンプルごとに異なる低分子標識化合物で蛋白質を標識し比較するラベル化定量法と標識化合物を用いないノンラベル法によって求められる。また、蛋白量はウェスタンブロットや免疫染色など別の方法で確認実験を行うことが求められる。

オミクス解析に共通する問題点

オミクス解析全体に共通の問題として、データ量が膨大であるため得られたデータの解析がとて複雑になったことが挙げられる。そこで近年では、Rやpythonといった無料で使えるソフトウェアのプログラムが日々開発・更新されている。近年はこうしたデータ解析の詳細まで参照できるyoutube (統合TVや研究者らの個人発信)や書籍, データを登録してウェブ上で解析アルゴリズムによって結果をみられるウェブサイト (<https://www.metaboanalyst.ca/>) が増えてきた。とはいえ、初心者はなかなか参入しづらいのが実情である。なるべく早く結果を解析したい場合は受託先に追加料金を支払ってデータ解析を依頼するのが良い。

現在はオミクス解析の敷居が低くなったともいえる状況であり、今後の形態学・病理学の分野では、上記で紹介したオミクス技術を組み合わせることで、新たな疾患バイオマーカーの開発や分子機序理解を基盤とした組織構築および組織構造異常の理解が進むものと期待される。

オミクス解析などを用いて見出された新規バイオマーカーを臨床で利用できるようにするには特許取得や種々の臨床試験を実施する必要がある。本学の本田一文大学院教授らが発見した膀胱がんマーカーである血中異常 apoA2 isoform はバイオマーカーとしての有用性を証明し、2022年に膀胱がん検診用の体外診断用医薬品としての製造販売承認申請がなされている⁷。バイオマーカーの実用化については、基礎研究で画期的なバイオマーカーを見出したとしても、診断薬として上市するためには多くの過程を経る。本稿では誌面の都合で扱えないため、実用化に際しての注意点や進め方についてよくまとめられた文献を紹介するので参照願いたい⁸。

5. オミクス解析の組織標本への応用

がん組織は様々な細胞から構成され、がん細胞をはじめ周囲の環境を形作る線維芽細胞、血管内皮細胞、種々の免疫細胞、がん幹細胞などから構成される不均一な状態である。このようながん細胞周囲の環境は『がん微小環境』と呼ばれ、腫瘍細胞の生育・維持や薬剤耐性に関わることが知られている。さらに、種々の細胞のサブタイプが多数存在することが示唆されているが、細胞の見た目が同じため、少し機能を変容したような亜型の細胞がどの位いるか現状では不明である。シングルセルオミクス解析は組織の細胞を一細胞まで分離しオミクス解析で遺伝子変異や遺伝子発現などをプロファイルする技術で、がん微小環境の解析に有用である。

Liらは11名の大腸がん患者から腫瘍部と同一患者の正常組織それぞれから細胞を微細流路チップを用いて分離し、シングルセル RNA-seq (scRNA-seq) で1細胞当たり 5,000~13,000 ほどの遺伝子発現を検出した⁹。これらをクラスタリング解析した結果、がん領域と正常領域で細胞の種類には大きな違いはなかった一方で、がん組織の線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) では特徴的に上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子群の高発現が認められた。顕微鏡像では細胞形態が同一で判別困難であったが、遺伝子発現プロファイルの違いから2種類のCAFサブタイプが同定された。このようにシングルセル解析は種々の細胞が入り混じった組織の構成細胞の亜型ですらも明らかにできる技術である一方で、細胞の空間的な位置情報が失われてしまうデメリットがある。上記の例でいえば、EMT 遺伝子群陽性のCAFががん細胞に隣接しているのかどうかはわからない。CAFのがん細胞への影響を議論する上では細胞の位置情報が重要になる。このシ

ングルセル解析のデメリットを解消すべく、空間オミクス解析が急速に発展している。

2016年Lundebergらにより、組織中の細胞情報とオミクス解析の網羅的分子解析技術を結び付けた空間トランスクリプトミクス (Spatial transcriptomics) という技術が報告された¹⁰。これは、組織上の網羅的遺伝子発現情報を細胞の位置情報と紐付けることで、組織中の『どの細胞がどんな遺伝子を発現しているか?』を空間的に把握することができる技術である。遺伝子発現のプロファイルが手に入れば、何の細胞かを同定することは既知の細胞マーカーの情報から容易にできる。技術的には mRNA 相補配列プローブを組織上でハイブリダイズさせ NGS でシーケンス解析することで組織上の測定スポット (100 μm 間隔) ごとの遺伝子発現プロファイルを得る。2018年には 10x Genomics 社より VISIUM として発売された。他に 100 種程度の抗体を用いて (マルチプレックス解析とも呼ばれる) 高解像度な空間蛋白発現プロファイルを得るプラットフォームも市販されている (表)。

このように組織上の特定の位置における遺伝子発現情報が一括して示せるようになったことの意義は形態学的・病理学的に大きな意味をもつ。例えば悪性腫瘍の浸潤領域は境界明瞭でないため正確に腫瘍細胞の浸潤先端部を見分けることは困難だが、空間オミクス解析を用いれば『正常細胞と異なる細胞群が組織上のどこにいるか』を示すことができ、その中から腫瘍細胞の位置を示せる可能性がある。現在、空間オミクス解析を精力的に行う研究者の間では、空間オミクスデータのレポジトリ化によるデータ共有が試みられている。各疾患のデータベースが作成され多くの研究者に共有・再利用されることで、各疾患の病変領域における細胞の働きやその周辺との相互作用の理解に大変有用となる。現状では、中国科学院が『Spatial DB』 (<http://www.spatialomics.org/SpatialDB/dataset.php>)¹¹ というデータベースを管理・公開している (図 3)。ただし収録データは多くないため、空間トランスクリプトミクスを実施する前のお試し利用に有用である。日本では JST の支援を受けた Systems Science of Biological Dynamics (SSBD) データベース¹² が空間トランスクリプトミクスデータを受け入れる方針を示しており、充実したメタデータ (データの内容を説明するためのデータ) や様々なデータフォーマットに対応したインターフェースの整備が期待されている。

6. おわりに

かつては形態学とオミクス解析の統合解析など考え

表 代表的な市販の空間オミクス解析プラットフォーム

(2023年2月1日時点の情報に基づく)

	検出プローブ	メーカー	検体種類	mRNA	蛋白質	分解能	最大面積 (mm)
GeoMX DSP	オリゴヌクレオチド および 抗体	NanoString 社	凍結 FFPE	≥1.8 万種	100 種	数 μm	14.1×35.3
PhenoCycler (旧 CODEX)	抗体	Akoya Biosciences 社	凍結 FFPE	—	≥100 種	200 nm	1 切片
Hyperion Imaging system	抗体	Standard Bio Tools 社	凍結 FFPE	—	40 種	1 μm	1 切片
VISIUM	オリゴヌクレオチド	10xGenomics 社	凍結 FFPE	≥2.0 万種	—	直径 55 μm 円形 (45 μm 間隔)	10×10
Stereo-Seq (STOmics)	オリゴヌクレオチド	BGI-research 社	凍結	≥2.0 万種	—	直径 220 nm 円形 (280~495 nm 間隔)	132×132

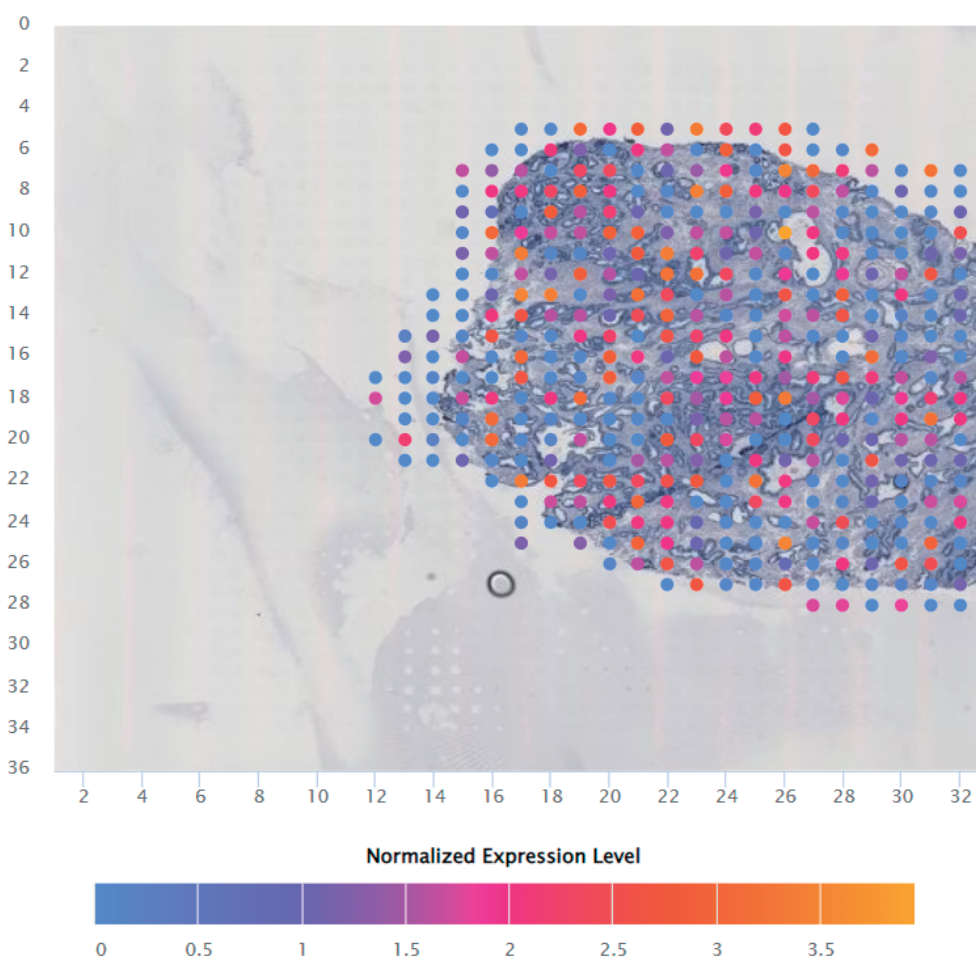


図3 Spatial DBを用いた前立腺がん組織における Androgen Receptor (AR) 発現の可視化。データベースに収集された解析データを用いている¹³⁾。スポット一つ一つがRNA-seqを実施した領域を示す。表示される蛋白質は、任意の蛋白質の GeneCards Symbol 名を入力するとかえられる。

られないくらいに離れた領域にあった。しかし、現在に至って測定機器の感度向上や様々なアルゴリズムの解析手法の急速な発展により、空間オミクス解析が実現された。VISIUMは、近い将来現在の100 μmとい

う分解能を向上した『VISIUM HD』にアップグレードされると発表されている。空間オミクス解析をはじめ、今後も驚くような技術進展とそれに伴う新たな発見が続くことが期待でき、その度に新たな生命の姿が

見えるようになるだろう。今後、『形態学×オミクス解析』は注目分野の一つである。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

文 献

1. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
2. FDA-NIH Biomarker Working Group: BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource, 2021 Jan 25: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/n/biomarkers/pdf/2023.2.1>
3. Kohno T, Kato M, Kohsaka S, et al: C-CAT: The National Datacenter for Cancer Genomic Medicine in Japan. *Cancer Discov* 2022; 12: 2509-2515.
4. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1675-1680.
5. Lanczky A, Gyorffy B: Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J Med Internet Res* 2021; 23: e27633.
6. Oulhen M, Pawlikowska P, Tayoun T, et al: Circulating tumor cell copy-number heterogeneity in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer resistant to ALK inhibitors. *NPJ Precis Oncol* 2021; 5: 67.
7. 本田一文 : がん早期診断・リスク層別化, 精密医療に資するバイオマーカー探索と社会実装を目指して. *日医大医会誌* 2021; 17: 146-157.
8. 青志津男 : 産学連携推進によるバイオマーカーの実用化. オミックスで加速するがんバイオマーカー研究の最新動向. 2015; pp 264-268, メディカルドゥ 大阪.
9. Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al: Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet* 2017; 49: 708-718.
10. Stuhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al: Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 2016; 353: 78-82.
11. Fan Z, Chen R, Chen X: SpatialDB: a database for spatially resolved transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: D233-D237.
12. Tohsato Y, Ho KH, Kyoda K, Onami S: SSBD: a database of quantitative data of spatiotemporal dynamics of biological phenomena. *Bioinformatics* 2016; 32: 3471-3479.
13. Berglund E, Maaskola J, Schultz N, et al: Spatial maps of prostate cancer transcriptomes reveal an unexplored landscape of heterogeneity. *Nat Commun* 2018; 9: 2419.

(受付 : 2023 年 2 月 1 日)

(受理 : 2023 年 3 月 24 日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。