

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15235

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳癌における上皮間葉転換関連因子の網羅的解析

研究課題名(英文) Genome-wide screening for epithelial mesenchymal transition (EMT)-related genes in triple-negative breast cancer

研究代表者

山本 瑞生 (YAMAMOTO, MIZUKI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90750365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)とその逆反応であるMETは癌悪性化の様々なステップで重要である。しかし現在までにEMT/METによる上皮・間葉形質の可塑性の詳細な分子機構は解明されておらずこの機構を標的とした治療法は存在しない。我々は以前に、Triple-negative乳癌(TNBC)において一部の細胞株では上皮様と間葉様の細胞が一定の比率で共存していることを見出し、腫瘍内の上皮・間葉形質の可塑性を解析可能なモデルとして提唱した。本研究では、この可塑性をCRISPR/Cas9とプール型gRNAによって網羅的に解析し、様々な遺伝子がTNBCの上皮・間葉形質の可塑性に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は外科的切除により予後が大きく改善する癌腫であるものの、現在でもTNBCなどでは転移が起きてしまうと予後を改善することは難しい。この転移を予防・治療するためにはその根本的な機構を解明する必要がある。上皮間葉転換(EMT)は転移や再発に重要な機構であるが、腫瘍内におけるEMTとその逆反応METの平衡関係を決定する機構はいまだによくわかっていない。本研究では転移を標的とした治療法開発を目的としてその機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and its reverse process, MET, are crucial in several stages of cancer metastasis. Spatiotemporally-coordinated mutual regulation between EMT and MET could occur during metastasis. To elucidate such regulation, we chose HCC38, a human TNBC cell line, because HCC38 is composed of epithelial and mesenchymal populations at a fixed ratio. First, we established EMT-reporter cells which have E-cadherin-promoter driven mKO2 and vimentin-promoter driven EGFP. Next, we tried to analyze the effect of CRISPR/Cas9-mediated gene knockout on EMT/MET plasticity. Results showed that mesenchymal population in HCC38 cells was significantly decreased or increased by gene knockout using gRNAs for ZEB1 or miR200c, respectively. In this study, we performed CRISPR/Cas9-mediated genome-wide screening to identify novel mechanisms for EMT-MET plasticity in triple-negative breast cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 上皮間葉転換 TNBC EMT MET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は発現プロファイルによって悪性度や治療戦略の異なるサブタイプに分類される。中でもトリプルネガティブ乳癌(TNBC)は既存の治療標的分子を発現せず化学療法が適応される。このTNBCには化学療法が比較的効きやすいBasal-like乳癌と化学療法に抵抗性を示すClaudin-low乳癌が混在しており、抗癌剤耐性機序の解明が求められている。Basal-like乳癌と比べてClaudin-low乳癌は上皮細胞マーカーの発現が低く、間葉系細胞のマーカーを高く発現することからBasal-like乳癌もしくはその起源となる細胞が上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)を起こしてClaudin-low乳癌が発生すると考えられる。我々は、いくつかのBasal-like乳癌細胞株で通常培養条件下で上皮様細胞と間葉様細胞が共存し自発的にEMTとその逆反応であるMETを起こして相互に変換することを明らかにした。

2. 研究の目的

HCC38細胞における自発的EMT/METの制御機構の詳細を明らかにすることで、TNBC内サブタイプの決定や抗癌剤耐性獲得機序を解明しTNBCの悪性化機序の理解および新規治療法の提唱を本研究の目的とした。これまでも様々なサイトカインや転写因子が上皮間葉転換を誘導することが分かっているが、実際の乳癌細胞における自発的なEMT/METの機序の解析がサブタイプ決定機構の解明やEMT/METを標的とした新規治療法の提唱に最も重要だと考えられる。また、代謝系酵素など既知のEMT/METシグナルとの関連が乏しい因子も上皮様・間葉様の性質決定への関与が報告されており、既知のEMT/MET関連因子の情報だけでなくHCC38細胞を用いた網羅的解析が全容の理解には必須である。

これまでのHCC38細胞のEMT関連転写因子の発現解析から、SnailやZEB1, ZEB2が間葉様細胞で高発現している一方、Slugは両画分で同程度に発現していることが分かった。これらの因子をsiRNAを用いて発現抑制し自発的EMT/METへの影響を検討したところSlugとZEB1が重要であった。興味深いことに間葉様細胞で顕著な高発現を認めたSnailやZEB2の発現抑制は影響を示さず、むしろ発現量に差がないSlugが重要であった。そこで、EMT/MET関連因子の探索には、発現量の比較だけでなく、機能的な遺伝子スクリーニングが必要だと考えた。

3. 研究の方法

gRNAとCRISPR/Cas9によって誘導される遺伝子機能欠損による自発的EMT/METの阻害

CRISPR/Cas9は標的DNAに相補的な配列をもつguide RNA (gRNA)によってDNAを配列特異的に切断する酵素である。培養細胞にCas9タンパクとgRNAを発現させるとゲノム中のgRNA標的配列に二本鎖切断を誘導出来る。切断されたゲノムDNAはnon-homologous end joining (NHEJ)によって修復される際に様々な大きさのDNA挿入や欠失が起きるため、標的配列が遺伝子の翻訳領域であった場合フレームシフトによる遺伝子欠損が起きる。実際にHCC38細胞に対して、ZEB1の翻訳領域を標的とするgRNAとCas9を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、ゲノム中に標的を持たないnon targeting gRNA (nt-gRNA)発現細胞と比較したところ、ZEB1を標的とするgRNA発現細胞では顕著な間葉様細胞画分の減少が認められた。実際にgRNA標的配列周辺のゲノムシーケンスを解析したところ、70%程度の高い効率で変異が導入されており、効率よく遺伝子機能を不活化出来ることが分かった。NHEJによる修復時に挿入・欠失が3の倍数の塩基数で起きてしまうとフレームシフトが起きずに機能的なZEB1が発現してしまうが、興味深いことにフレームシフトの有無はgRNA標的周辺のDNA配列に強く依存する。そのため1つの遺伝子に対して複数のgRNAを設計すれば効率よく遺伝子機能欠損を誘導出来るgRNAが得られる。申請者の経験では半数以上のgRNAで効率的な遺伝子機能欠損が確認出来ており、1遺伝子につき3種類のgRNAを準備すれば機能的な解析が可能と考えた。

gRNAライブラリによる網羅的な遺伝子機能欠損による自発的EMT/MET関連因子の探索

ZEB1を標的としたgRNA導入で見られた間葉様細胞の減少がサイトカイン等の産生を介したのではなくcell intrinsicなEMT抑制効果であると仮定すると、複数のgRNAを混合して導入した際にも、EMT/METに影響を与えるgRNAを発現する細胞は上皮様・間葉様画分で存在の偏りが出来ると考えられた。このgRNA発現細胞の偏在を解析することで自発的EMT/MET制御因子の機能的なスクリーニングが可能と考えた。Addgeneから購入したCas9/gRNAライブラリ(Human CRISPR Knockout Pooled Library:GeCKO v2)をHCC38細胞に導入し、遺伝子機能欠損とEMT/MET変化に十分な時間培養を行った。その後、フローサイトメーターで上皮様・間葉様細胞を分離し、ゲノムに組み込まれた各gRNA配列の割合を次世代シーケンサーで解析し存在比の偏りを調べた。

フローサイトメーターによる上皮様・間葉様細胞の分画に利用可能なレポーター細胞の樹立

本研究で解析予定のgRNAライブラリは約20000遺伝子について各3種類のgRNAが含まれており合計60000種のgRNAからなる。これらの定量的な解析には各gRNAについて300 copy程度を解析する必要がある。HCC38細胞にはMOI=4程度でレンチウイルス感染が可能なので少なくとも約 4.5×10^6 細胞($60000 \times 300 \div 4$)をフローサイトメーターで分取する必要がある。しかし従来のEpCAM/CD44抗体染色ではこの数の細胞を安定して染色することが困難なため、上皮様・間葉様の性質を蛍光タンパク質の発現で解析可能なレポーター細胞を樹立して用いる。具体的には両画分で大きく発現が異なるE-cadherinとVimentinのプロモーター下流で2種類の蛍光タ

ンパク質が制御されるレポーター遺伝子を HCC38 細胞に導入することで抗体染色をせずに上皮様・間葉様細胞を分取することを目指した。

4. 研究成果

EMT 関連遺伝子に対する gRNA の導入による上皮間葉画分の制御

まず最初に gRNA による既知の EMT 関連因子のノックアウトによる影響を検討した。標的とする遺伝子には HCC38 細胞において EMT を誘導することが分かっている転写因子 ZEB1、SNAI2、EMT を阻害することが予想される mRNA200c, mRNA144 を用いた。コントロールとして、ヒトゲノム中に標的配列を持たない gRNA 配列を 3 種類設計した。これらの gRNA を Cas9 と共に発現させるため LentiCRISPRv2 ベクターを用いて組み換えレンチウイルスを作成して HCC38 細胞に導入して puromycin による選択を行った結果、ZEB1 や SNAI2 を標的とする gRNA を導入することで約 3 週間で間葉系細胞の画分が有意に減少し、mRNA200c, mRNA144 に対する gRNA を導入することで間葉系画分が有意に増加することが分かった。この結果から、gRNA を用いることで標的遺伝子の EMT/MET に与える影響を検討出来ることが明らかとなった。

混合 gRNA を用いて上皮間葉画分間における EMT に重要な gRNA の濃縮の検討

次に混合 gRNA から EMT に機能的に重要な gRNA を検出する手法について検討を行った。コントロール gRNA に対して 1/10000 量 ZEB1 に対する gRNA を混合したテスト用 gRNA プールを作成し、この gRNA プールから組み換えレンチウイルスを調整して HCC38 細胞へ感染させた。感染細胞を選択後 3 週間継代培養し、上皮画分と間葉画分を CD44/EpCAM 染色による FACS 解析によって分取した。それぞれの画分からゲノム DNA を調整し、gRNA 周辺配列を共通プライマーによって増幅した。この gRNA 周辺配列に含まれる ZEB1 に対する gRNA の存在量を qPCR によって測定し、上皮画分と間葉画分における存在比を評価した。その結果、ZEB1 を標的とする gRNA は間葉系画分でその存在比が 50%程度まで大きく減少するのに対して、コントロール gRNA の変動はほとんどなく、この手法を用いることで gRNA プールから EMT に機能的な遺伝子に対する gRNA を抽出することが可能であることが分かった。

E-cadherin, Vimentin プロモーターを用いたレポーター細胞の作成

実際のゲノムワイドスクリーニングには 2 万遺伝子に対して 3 本ずつ gRNA が設計された合計 6 万種類の gRNA プールを用いる。gRNA のダイバーシティを維持したまま多数の細胞を解析するためには抗体染色による上皮細胞と間葉細胞の分取を安定的に行うことは難しい。そこで上皮間葉画分間で mRNA 発現が大きく異なる E-cadherin と Vimentin のプロモーターを用いて書くプロモーターの下流に異なる蛍光タンパク質をコードする遺伝子を持つレポーターを組み換えレンチウイルスを用いて HCC38 細胞に導入した。適切なプロモーター長、および蛍光タンパク質の組み合わせを検討した結果、E-cadherin プロモーター下に mKusabira-Orange 遺伝子、Vimentin プロモーター下に EGFP 遺伝子を導入したレポーター遺伝子と共に薬剤選択マーカーを持つ組み換えレンチウイルスの作成に成功し、レポーター細胞を樹立した。

EMT 関連遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

結果 および からゲノムワイドスクリーニングを行う準備が整ったため、2 万遺伝子に対する 6 万 gRNA プールを 2 種類用いてスクリーニングを行い、レポーター活性を指標として上皮間葉画分を分取してゲノム DNA を抽出した。ここから gRNA 周辺配列を共通プライマーで増幅精製後次世代シーケンサーによって含まれる gRNA を配列ごとに解析した。得られた結果を上皮、間葉画分ごとに集計してその存在比を計算した。存在比が大きく変動した遺伝子を標的とする gRNA を発現する組み換えレンチウイルスを作成して検証を行い、既知の EMT/MET 制御因子に加えて、これまでに EMT/MET への関与が報告されていない多数の因子 (EMT 促進因子 16 遺伝子 MET 促進因子 3 遺伝子) が機能的に EMT に重要であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuki Yamamoto, Qingling Du, Jiping Song, Hongyun Wang, Aya Watanabe, Yuetsu Tanaka, Yasushi Kawaguchi, Jun-ichiro Inoue and Zene Matsuda	4. 巻 294(14)
2. 論文標題 Cell-cell and virus-cell fusion assay-based analyses of alanine insertion mutants in the distal 9 portion of the JRFL gp41 subunit from HIV-1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5677-5687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto M, Abe C, Wakinaga S, Sakane K, Yumiketa Y, Taguchi Y, Matsumura T, Ishikawa K, Fujimoto J, Semba K, Miyauchi M, Akiyama T & Inoue JI.	4. 巻 2
2. 論文標題 TRAF6 maintains mammary stem cells and promotes pregnancy-induced mammary epithelial cell expansion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology.	6. 最初と最後の頁 Article Num.292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s42003-019-0547-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山本瑞生
2. 発表標題 Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本瑞生、井上純一郎
2. 発表標題 Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部知帆、山本瑞生、井上純一郎
2. 発表標題 The CRISPR-Cas9-mediated gene knockout system to identify tumor suppressor genes in basal-like breast cancer mouse model
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本瑞生、井上純一郎
2. 発表標題 TRAF6は乳腺上皮幹細胞の維持および乳腺上皮細胞の増殖と生存の促進によって妊娠期の乳腺発達を促進する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部知帆、山本瑞生、井上純一郎
2. 発表標題 Basal-like乳癌モデルマウスにおけるゲノム編集技術CRISPR-Cas9を利用した癌抑制遺伝子評価系の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue
2. 発表標題 Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chiho Abe, Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue
2. 発表標題 The CRISPR-Cas9-mediated gene knockout system to identify tumor suppressor genes in basal-like breast cancer mouse model
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa and Jun-ichiro Inoue
2. 発表標題 The CRISPR/Cas9-mediated gene knockout screening to analyze EMT-MET plasticity in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa and Jun-ichiro Inoue
2. 発表標題 Genome wide screening for regulator of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 The 9th EMT International Association Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Kiyoshi Yamaguchi, Yoichi Furukawa and Jun-ichiro Inoue
2. 発表標題 The CRISPR/Cas9-mediated gene knockout screening to analyze EMT-MET plasticity in triple-negative breast cancer
3. 学会等名 Cell symposia: Hallmarks of Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----