

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07610

研究課題名(和文) Basal-like乳癌悪性化機構の解明を目指した自発的上皮間葉転換の解析

研究課題名(英文) Genome-wide screening for EMT-MET plasticity 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・特任講師

研究者番号：90750365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞がその特性を失って間葉系細胞の形質を獲得する上皮間葉転換(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。EMTは癌細胞の細胞死抵抗性や運動性を亢進させて治療後の再発や転移の初期段階である血管への移行を促進する。一方、遠隔臓器へ移動した癌細胞はMETによって上皮様形質を再獲得し活発に増殖して転移巣を形成する。本研究では乳癌におけるEMT/METの可塑性を制御する遺伝子の探索を目的としてCRISPR/Cas9とプール型gRNAによる網羅的な遺伝子スクリーニングを行い、これまでにEMT/METへの関与が知られていない種々の新規のEMT関連遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は転移が見られないステージ0やステージIでは予後が非常に良いにもかかわらず、転移が見られるステージII以降の症例では5年生存率が急激に低下してしまう。癌細胞の上皮間葉転換(EMT)は転移に密接にかかわることが示唆されており、本研究で実施した新しいEMT関連遺伝子群の探索は癌悪性化の機構解明に繋がるだけでなくEMTを標的とした新しい乳癌治療法開発にも寄与すると考えられ、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT), in which epithelial cells lose their characteristics and undergo mesenchymal cell phenotype, and the reverse reaction, MET, are important in various steps of malignant transformation of cancer: EMT enhances resistance to cell death and motility of cancer cells and promotes their migration to blood vessels, the initial stage of metastasis and recurrence after treatment. On the other hand, cancer cells migrating to distant organs recapitulate epithelial-like phenotype through MET and actively proliferate to form metastatic nests. In this study, we performed a comprehensive gene screening using CRISPR/Cas9 and pooled gRNAs to identify genes that regulate EMT/MET plasticity in breast cancer and found several novel EMT-related genes that have not been previously reported to be involved in EMT/MET.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳癌 上皮間葉転換 EMT CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

【学術的背景 1: 乳癌のサブタイプと現状の治療戦略】 乳癌は遺伝子発現プロファイルから5つのサブタイプに分類される。約7割を占める Luminal-like 乳癌はホルモン受容体(ESR, PGR)依存的に増殖し、内分泌療法が有効である。約2割を占める ERBB2-enriched 乳癌は ERBB2 遺伝子増幅により発生し、抗 ERBB2 抗体により免疫細胞による細胞傷害が引き起こされる。一方で Basal-like 乳癌や Claudin-low 乳癌はこれらの治療標的を発現せずトリプルネガティブ乳癌(TNBC: ER-, PGR-, ERBB2-)と呼ばれ約1割の乳癌患者に見られる。TNBC の治療には化学療法が用いられるが、Basal-like 乳癌は比較的抗癌剤に感受性を示すものの Claudin-low 乳癌は抵抗性を示す。また Claudin-low 乳癌は高い浸潤能を持ち悪性化機序の解明が求められていた。

【学術的背景 2: Basal-like 乳癌と Claudin-low 乳癌の形質の変化】

Basal-like 乳癌と Claudin-low 乳癌の成り立ちについては前述のように「EMTにより Basal-like 乳癌が Claudin-low 乳癌へ変化する」という悪性化説や「Basal-like 乳癌は正常 Luminal 前駆細胞から発生し、Claudin-low 乳癌は正常乳腺幹細胞から発生する」という起源細胞が異なる Cell of origin 仮説等の諸説がある。近年転写因子 Sox9 と EMT 誘導因子 Slug の発現量変化による Luminal 前駆細胞と乳腺幹細胞の間の可塑性が示されており(Guo W *et al. Cell*, 2012)、正常乳腺細胞の分化・脱分化にも EMT/MET が関与することが示唆される。以上から、起源細胞や癌細胞における遺伝子変異や環境要因による EMT/MET の制御がサブタイプ決定や TNBC の悪性化に重要と考えられた(図1)。

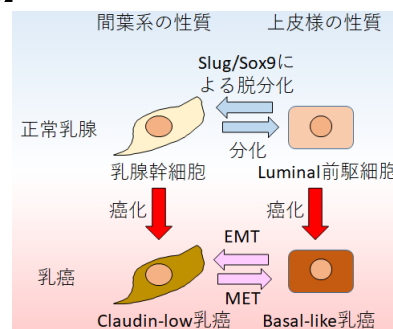


図1 Basal-like 乳癌と Claudin-low 乳癌の比

【学術的背景 3: Basal-like 乳癌における EMT/MET の両方向の制御】

以前に我々は一部の Basal-like 乳癌細胞株 (HCC38 細胞など) における上皮細胞マーカー E-cadherin や EpCAM を強く発現する集団(図2 上皮様画分)と、Vimentin や CD44 を強く発現し Claudin-low 乳癌と似た性質の集団(図2 間葉様画分)の共存を見出した(Yamamoto *et al. Cancer Sci.*, 2017)。これらの細胞株では通常の培養条件下で EMT と MET を起こして相互に変換し、両集団が一定の割合で維持されている。我々はこの自発的 EMT/MET がサブタイプ決定や悪性化に重要な機構と考え解析を進めている。これまでに TGF \cdot や EMT 誘導転写因子 ZEB1 の関与が明らかであるがその分子機構の全貌は未解明であった。

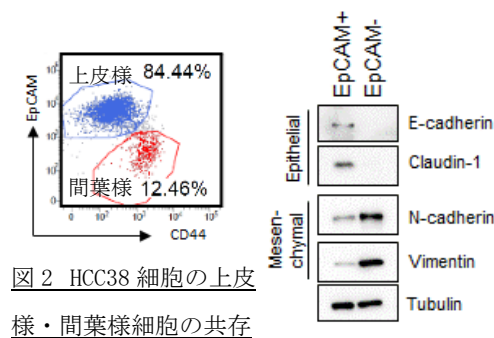


図2 HCC38 細胞の上皮様・間葉様細胞の共存

2. 研究の目的

・ Basal-like 乳癌における自発的 EMT/MET 制御機構の解明

こうした背景から我々は 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 内のサブタイプ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目的とした。本研究では EMT/MET の解析にフローサイトメーター(FACS)による上皮様・間葉様細胞の存在比の評価を用いた。これにより従来の細胞集団全体における上皮マーカーや間葉マーカーの発現解析よりも感度良く正確に EMT や MET を解析出来ると考えた。また、これまでに EMT/MET を制御する因子として様々なサイトカインや転写因子が知られていたが、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にも上皮様・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網羅的かつ機能的なスクリーニングが必要であった。本研究で実施した網羅的スクリーニングによって既知の関連因子のネットワークだけでなく、新規の EMT/MET 制御因子やシグナル伝達の発見を目指した。

3. 研究の方法

・ CRISPR/Cas9 を用いた EMT/MET 制御因子の探索

様々な遺伝子に対する gRNA プールを混合して導入すると、細胞毎に異なる遺伝子を欠損した集団が形成される。EMT/MET に影響を与える gRNA 発現細胞は上皮様・間葉様画分で存在が偏る

と考えられる(図3 間葉様細胞中の ZEB1-gRNA 発現細胞の減少、miR200c-gRNA 発現細胞の増加)。この gRNA 発現細胞の偏在を解析すれば自発的 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。実際にはヒト約 2 万遺伝子に対する gRNA プールを導入し、遺伝子欠損と EMT/MET 変化に十分な時間(3 週間)培養後、FACS で両画分を分取してゲノム中の各 gRNA 配列の存在比を次世代シーケンサーで解析した。

・候補因子の EMT/MET 促進機構の解明

次にこれらの候補因子の EMT/MET 促進機序を解析する。これまでの解析から、EMT を促進する転写因子 ZEB1 とその転写を抑制する GRHL2 や OVOL1/2、翻訳を抑制する miR200c によるネガティブフィードバックループが上皮様・間葉様の性質決定に重要なことが分かっている。そこでまず、候補因子を CRISPR/Cas9 や siRNA によって発現抑制、もしくは cDNA により過剰発現した際の ZEB1 等の発現や機能に与える影響を解析する。更に候補因子を発現抑制・過剰発現させた際の遺伝子発現プロファイルを上皮様・間葉様細胞を FACS により分取して解析し、各画分における遺伝子発現変化から EMT/MET への経路を推測した。

4. 研究成果

本研究ではまず、乳癌細胞株 HCC38 細胞で上皮様および間葉様細胞を分取するために E-cadherin と Vimentin プロモーターを用いた蛍光レポーター細胞を作成した(図4)。

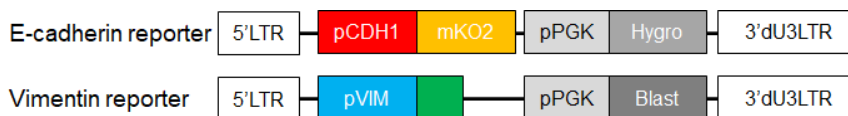


図4 EMT/MET をリアルタイムに判定するためのレポーター構造

このレポーターを導入した細胞から実際にレポーターの蛍光を指標として細胞を分取したところ、内在性の EpCAM および CD44 の発現パターンおよび E-cadherin や N-cadherin などの発現量から、期待通りに上皮・間葉細胞を分取可能なことを確認した(図5)。

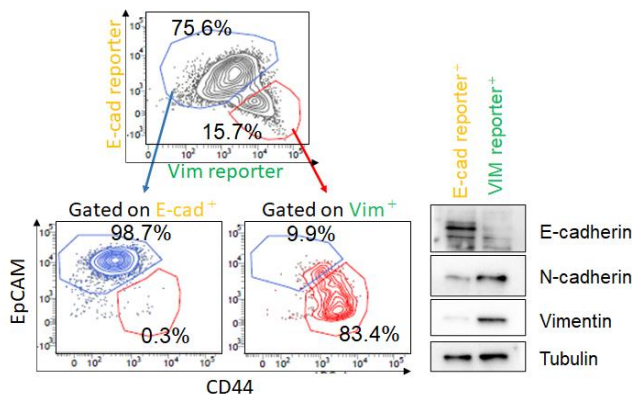


図5 レポーター細胞を用いた上皮・間葉画分の分取

次にこの細胞を用いて EMT/MET 可塑性を制御する遺伝子探索を目的として CRISPR/Cas9 とプール型 gRNA による網羅的な遺伝子スクリーニングを行った。2 万遺伝子に対する gRNA を導入し、上皮画分および間葉画分に濃縮される遺伝子を同定した。具体的には各画分における gRNA の存在比を指標として遺伝子を絞り込み、その後、実際に単一の gRNA によるノックアウトを行って EMT/MET への影響を検証した結果、HCC38 細胞では約 40 遺伝子が EMT を促進、約 20 遺伝子が MET を促進していた(図6, 7)。

現在論文準備中のこれらの遺伝子の中にはこれまで EMT/MET への関与が知られていない遺伝子が数多く含まれていた。さらにこれらの遺伝子のパスウェイ解析によって協調して EMT/MET 可塑性を制御する複数の遺伝子群を見出した。

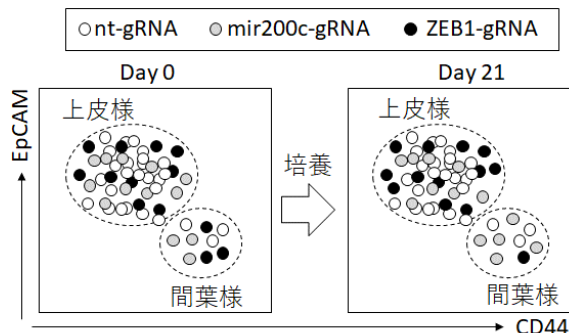


図3 gRNA プールの上皮様・間葉様における偏在

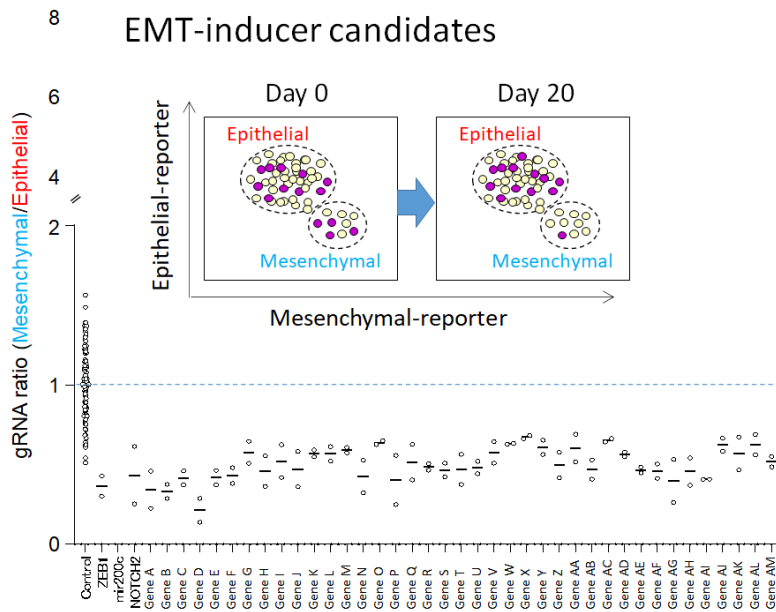


図6 スクリーニングから見出した EMT 関連遺伝子群。得られた遺伝子 Gene A~Gene AM は既知の EMT 誘導遺伝子 ZEB1 のようにノックアウトすることで間葉画分の減少が見られ、EMT に重要であることが示唆された。

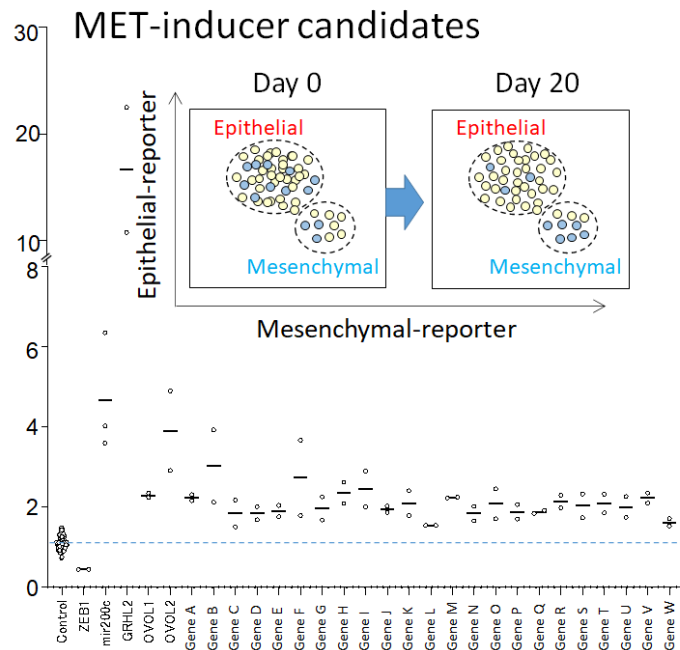


図7 スクリーニングから見出した MET 関連遺伝子群。得られた遺伝子 Gene A~Gene W は既知の MET 誘導遺伝子 Mir200c や GRHL2 のようにノックアウトすることで間葉画分の増加が見られ、MET に重要であることが示唆された。

以上の結果から HCC38 細胞の EMT/MET 可塑性の維持には多数の遺伝子が協調して関与する複雑な機構が存在することが示唆された。各遺伝子をノックアウトすることで可塑性に一定の影響を与えられることから、阻害剤などを用いた複数の標的に対する治療法が効果的と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Mizuki, Gohda Jin, Kobayashi Ayako, Tomita Keiko, Hirayama Youko, Koshikawa Naohiko, Seiki Motoharu, Semba Kentaro, Akiyama Tetsu, Kawaguchi Yasushi, Inoue Jun-ichiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Metalloproteinase-dependent and TMPRSS2-independent cell surface entry pathway of SARS-CoV-2 requires the furin-cleavage site and the S2 domain of spike protein | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 BioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.12.14.472513 | 査読の有無 無 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Hayashi Yusuke, Nakayama Jun, Yamamoto Mizuki, Maekawa Masashi, Watanabe Shinya, Higashiyama Shigeki, Inoue Jun-ichiro, Yamamoto Yusuke, Semba Kentaro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Aberrant accumulation of NIK promotes tumorigenicity by dysregulating post-translational modifications in breast cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 BioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.08.27.457878 | 査読の有無 無 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Yamamoto Mizuki, Tomita Keiko, Hirayama Youko, Inoue Jun-ichiro, Kawaguchi Yasushi, Gohda Jin | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 SARS-CoV-2 Omicron spike H655Y mutation is responsible for enhancement of the endosomal entry pathway and reduction of cell surface entry pathways | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 BioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.03.21.485084 | 査読の有無 無 |
| 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 - |
| 1. 著者名 YAMAMOTO Mizuki, GOHDA Jin | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Cell-based membrane fusion assays with viral fusion proteins for identification of entry inhibitors | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Translational and Regulatory Sciences | 6. 最初と最後の頁 72～76 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33611/trs.2021-011 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Takeuchi Yasuto, Kimura Natsuko, Murayama Takahiko, Machida Yukino, Iejima Daisuke 他 | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 The membrane-linked adaptor FRS2 fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2103658118 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2103658118 | 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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Kandeel Mahmoud, Yamamoto Mizuki, Park Byoung Kwon, Al-Taher Abdulla, Watanabe Aya, Gohda Jin, Kawaguchi Yasushi, Oh-hashii Kentaro, Kwon Hyung-Joo, Inoue Jun-ichiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Discovery of New Potent anti-MERS CoV Fusion Inhibitors | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 685161 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.685161 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 YAMAMOTO Mizuki, GOHDA Jin, AKIYAMA Taishin, INOUE Jun-ichiro | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) plays crucial roles in multiple biological systems through polyubiquitination-mediated NF- B activation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B | 6. 最初と最後の頁 145 ~ 160 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.97.009 | 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 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto M, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Imai M, Takeda M, Kinoshita N, Ohmagari N, Gohda J, Semba K, Matsuda Z, Kawaguchi Y, Kawaoka Y, Inoue JI. | 4. 巻 12(6) |
| 2. 論文標題 The Anticoagulant Nafamostat Potently Inhibits SARS-CoV-2 S Protein-Mediated Fusion in a Cell Fusion Assay System and Viral Infection In Vitro in a Cell-Type-Dependent Manner. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 629 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12060629 | 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 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto M, Ichinohe T, Watanabe A, Kobayashi A, Zhang R, Song J, Kawaguchi Y, Matsuda Z, Inoue JI. | 4. 巻 12 (12) |
| 2. 論文標題 The Antimalarial Compound Atovaquone Inhibits Zika and Dengue Virus Infection by Blocking E Protein-Mediated Membrane Fusion. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 1475 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12121475 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kandeel M, Yamamoto M, Tani H, Kobayashi A, Gohda J, Kawaguchi Y, Park BK, Kwon HJ, Inoue JI, Alkattan A. | 4. 巻 in press. |
| 2. 論文標題 Discovery of new fusion inhibitor peptides against SARS-CoV-2 by targeting the spike S2 subunit. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules & Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 in press. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kandeel Mahmoud, Yamamoto Mizuki, Al-Taher Abdulla, Watanabe Aya, Oh-hashii Kentaro, Park Byoung Kwon, Kwon Hyung-Joo, Inoue Jun-ichiro, Al-Nazawi Mohammed | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Small Molecule Inhibitors of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion by Targeting Cavities on Heptad Repeat Trimers | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomolecules & Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 311 ~ 319 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4062/biomolther.2019.202 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本瑞生 |
| 2. 発表標題 、ウイルスエンベロープタンパク質依存性膜融合の定量のための細胞融合アッセイの確立 |
| 3. 学会等名 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本瑞生, 井上純一郎, 川口寧, 合田仁 |
| 2. 発表標題 新型コロナウイルスのエンベロープタンパク質を用いた細胞融合アッセイの確立 Cell-based high throughput membrane fusion assay for SARS-CoV-2. |
| 3. 学会等名 2021年度若手支援技術講習会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本瑞生, 井上純一郎, 川口寧, 合田仁 |
| 2. 発表標題 、ウイルスエンベロープタンパク質依存性膜融合の定量化のための細胞融合アッセイの確立Establishment of a cell fusion assay for the quantification of viral envelope protein-dependent membrane fusion. |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue, Yasushi Kawaguchi, Jin Gohda |
| 2. 発表標題 Cell-based membrane fusion assay for flavivirus envelope proteins. |
| 3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue, Yasushi Kawaguchi and Jin Gohda. |
| 2. 発表標題 Cell-based high throughput membrane fusion assay for SARS-CoV-2 S protein. |
| 3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Kiyoshi Yamaguchi, Jin Gohda, Yoichi Furukawa and Jun-ichiro Inoue. |
| 2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたトリプルネガティブ乳癌におけるEMT/MET可塑性制御機構の解析 The CRISPR/Cas9-mediated gene knockout screening to analyze EMT-MET plasticity in triple-negative breast cancer |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Jun-ichiro Inoue, Yasushi Kawaguchi, Jin Gohda. |
| 2. 発表標題 SARS-CoV-2 S依存的な細胞融合アッセイによる抗血液凝固剤ナファモスタットの抗ウイルス感染作用の発見 The anticoagulant Nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 S protein-mediated fusion in a cell fusion assay system and viral infection in vitro in a cell-type-dependent manner. |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizuki Yamamoto, Kiyoshi Yamaguchi, Jin Gohda, 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 第79回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|