

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07708

研究課題名（和文）シングルセル解析を基軸とした乳がんの層別化と病態解明

研究課題名（英文）Stratification of breast cancer based on single-cell analysis

研究代表者

丸山 玲緒（MARUYAMA, Reo）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：60607985

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）：本研究では、ヒトの乳がん組織を対象に単一細胞エピゲノム解析を行い、がんを構成する細胞種やそのエピゲノムの不均一性について解析した。さらに、エストロゲン受容体モチーフの活性やその標的遺伝子の腫瘍内不均一性に注目し、内分泌抵抗性との関連性について考察した。さらに、自験例とTCGA乳がんコホートのデータを統合的に解析し、ER結合領域のアクセシビリティが低下しているがER発現は維持されている乳がんサブグループを同定した。これらの結果から、乳がん細胞のエピジェネティックな不均一性が内分泌抵抗性や予後不良と関連する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲン受容体(ER)陽性乳がんは、世界で新規に診断される全乳がんの70%を占める。ER陽性乳がんにはERシグナルを遮断する内分泌療法が著効するが、約20%の患者で治療後に再発する。本研究はER陽性乳がん患者にはエピゲノムレベルでの多様性が存在することを明らかにしたが、それが将来の治療抵抗性を予測しうるものであれば、早期診断や早期治療介入といった応用が可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, single-cell epigenomic analysis was performed on human breast cancer tissue to analyze the cell types constituting cancer and their epigenomic heterogeneity. Furthermore, we focused on the activity of the estrogen receptor motif and the intra-tumor heterogeneity of its target genes and discussed their relevance to endocrine resistance. Furthermore, an integrated analysis of data from autologous cases and the TCGA breast cancer cohort identified breast cancer subgroups with reduced accessibility of ER-binding regions but maintained ER expression. These results suggest that epigenetic heterogeneity of breast cancer cells may be associated with endocrine resistance and poor prognosis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：乳がん 腫瘍内不均一性

## 1. 研究開始当初の背景

乳癌は腫瘍毎に生物学的特性が大きく異なるヘテロな疾患群であり、各症例に最適な医療を提供するためには、より精密な症例の層別化と各々の病態の正確な理解が必要となる。腫瘍の特性を精緻に記述するためには、腫瘍内の「個々のがん細胞の機能的特性とその多様性の度合い」を正確にアセスメントすること、かつ腫瘍を構成する「非がん細胞(免疫細胞や間質細胞等)の種類と割合」を正確に測定すること、この2点が重要であると考えている。これを一度に可能とするのが近年急速な技術革新が進んでいるシングルセル解析の手法であり、特にシングルセル ATACseq (scATACseq) 法は細胞種の同定や機能的特性の評価に関するデータを低コストで安定的に取得できる画期的手法である。

## 2. 研究の目的

本研究を行う目的は、scATACseq 法を用いて乳癌検体から正確なデータを取得することが現実的に可能か、また可能であるならばそれは臨床的に有用な情報を持ちうるか、この2点を検証することである。初めに scATACseq 法を確立したのちに、以下の3点を明らかにする。

scATACseq 法により、腫瘍を構成するがん細胞の機能的特性とその多様性の度合いを正確に記述することができるか

scATACseq 法により、腫瘍を構成する非がん細胞(免疫細胞、間質細胞など)の種類や特性を評価・定量できるか

上記の情報を利用して、あるいは scATACseq データから直接、腫瘍の薬剤応答性や転移能など腫瘍のふるまいを予測することは可能であるか

## 3. 研究の方法

乳癌患者から手術により摘出した腫瘍組織を針生検で採取し、MACS dissociator を用いて単一細胞へ分離した。分離した細胞に対して、BioRad の ddSEQ を用いた droplet-based scATAC-seq 解析を適用した。

さらに、独自に精製した Transposase にインデックス配列を付与することで、サンプルのマルチプレキシングを可能にする dsciATAC-seq 法を確立 (Lareau CA, et al., 2019, Nat Biotech)。この方法を先述の手術摘出検体に適用し、scATAC-seq 解析を実施した。

得られた scATAC-seq データの解析には、解析パッケージである snapATAC と ArchR を使用した。各種のマーカー遺伝子の推定発現量と転写因子モチーフの解析により、細胞種を同定した。さらに、癌細胞クラスターの同定を行い、症例間の多様性および腫瘍内の癌細胞の不均一性についての分析を行った。

## 4 . 研究成果

本研究では、ヒトの乳がん組織を対象にシングルセル染色体アクセシビリティプロファイリングを行った。16 症例の乳がん組織 (Luminal 型 11 例、Luminal-HER2 型 1 例、HER2 陽性型 1 例、トリプルネガティブ型 3 例) から scATAC-seq 解析を実施し、12,452 細胞のクロマチンアクセシビリティプロファイルを取得した。このプロファイルに基づき、25 の細胞クラスターを同定した。各種マーカー遺伝子の推定発現量や転写因子モチーフ解析から、癌細胞、繊維芽細胞、内皮細胞、白血球、T 細胞、B 細胞などの細胞種を同定した。

上皮細胞のみを抽出し再度クラスター解析を行い、18 種類の細胞クラスターを同定した。ほとんどが単一の症例由来であることから、症例間の強い多様性の存在が示唆された。遺伝子活性、モチーフエンリッチメント、遺伝子発現プロファイルを評価することで、各癌細胞種の特徴は記述可能であった。

次に ER モチーフの活性やそのターゲット遺伝子の腫瘍間ならびに腫瘍内の不均一性についても解析したところ、単一の ER 陽性症例検体において、ER 結合モチーフへのアクセス性が異なる 2 つの細胞集団の存在を確認した。そのうち ER 結合モチーフのアクセス性が低下している細胞集団では、乳がんの内分泌抵抗性に関与している転写因子 GRHL2 結合モチーフのアクセシビリティが上昇していることが明らかとなった。さらに GRHL2 結合モチーフを持つ遺伝子転写制御領域 (CREs) の活性は、内分泌抵抗性、転移、治療予後不良に関わる遺伝子領域の活性と相関していることが示された。以上より、がん細胞のエピゲノムの不均一性が乳がん患者の内分泌抵抗性や予後不良と関連する可能性が示唆された。

また上記 scATAC-seq で得られたデータを活用し、自験例 42 例の手術検体の ATAC-seq データと、TCGA 乳がんコホートの 45 例の ATAC-seq データに対して deconvolution を実施し、がん細胞からのシグナルを濃縮したデータを作製した。そこから得られた CRE プロファイルにより ER 陽性検体は 3 つのサブグループに分類され、そのうちの一群は ER 自体の発現や ER 標的遺伝子の発現は維持されていたが、ER 結合領域のアクセス性が低下していた。同様のサブグループは TCGA 乳がんコホートでも観察された。以上より、ER 発現は低下していないが ER 結合領域のアクセス性が低下している症例、すなわち診療で用いられる ER の染色では識別できない症例群の存在が明らかとなった。

これらのことから、乳がんにおいては、乳がん細胞のエピジェネティックな腫瘍間ならびに腫瘍内不均一性を評価することの重要性が示唆された。

## 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 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kumegawa Kohei, Yang Liying, Miyata Kenichi, Maruyama Reo	4. 巻 13
2. 論文標題 FOXD1 is associated with poor outcome and maintains tumor-promoting enhancer?gene programs in basal-like breast cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	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） 10.3389/fonc.2023.1156111	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 Saeki Sumito, Kumegawa Kohei, Takahashi Yoko, Yang Liying, Osako Tomo, Yasen Mahmut, Otsuji Kazutaka, Miyata Kenichi, Yamakawa Kaoru, Suzuka Jun, Sakimoto Yuri, Ozaki Yukinori, Takano Toshimi, Sano Takeshi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Yao Ryoji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 25
2. 論文標題 Transcriptomic intratumor heterogeneity of breast cancer patient-derived organoids may reflect the unique biological features of the tumor of origin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research	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） 10.1186/s13058-023-01617-4	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 Kumegawa Kohei, Saeki Sumito, Takahashi Yoko, Yang Liying, Osako Tomo, Nakadai Tomoyoshi, Amino Sayuri, Maeda Tetsuyo, Takahata Chikako, Mori Seiichi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 128
2. 論文標題 Chromatin profile-based identification of a novel ER-positive breast cancer subgroup with reduced ER-responsive element accessibility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1208 ~ 1222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02178-1	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 Nakadai Tomoyoshi, Yang Liying, Kumegawa Kohei, Maruyama Reo	4. 巻 50
2. 論文標題 Estrogen receptor K303R mutation reorganizes its binding to forkhead box protein A1 regions and induces chromatin opening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-08089-3	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 Kumegawa Kohei, Takahashi Yoko, Saeki Sumito, Yang Liying, Nakadai Tomoyoshi, Osako Tomo, Mori Seiichi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 8
2. 論文標題 GRHL2 motif is associated with intratumor heterogeneity of cis-regulatory elements in luminal breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Breast Cancer	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) 10.1038/s41523-022-00438-6	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11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 丸山玲緒
2. 発表標題 乳がんの多様性の解析
3. 学会等名 第6回理論免疫学ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山玲緒
2. 発表標題 がん研究における1細胞オミックス解析の現状と展望
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山玲緒、桑川昂平、佐伯澄人、高橋洋子、中太智義、野田哲生、大野真司、上野貴之
2. 発表標題 Dissecting tumor heterogeneity and cancer cell plasticity in human breast cancer with chromatin accessibility profiling
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 丸山玲緒、高橋洋子、佐伯澄人、糸川昂平、楊麗英、大野真司、上野貴之
2. 発表標題 乳癌の生物学的特性の評価におけるシングルセルATAC-seq解析の有用性
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山玲緒
2. 発表標題 シングルセル解析による乳がん多様性評価の試み
3. 学会等名 JST MIRAI会議・令和3年度シンポジウム・社会実装を目指した異分野融合生物学
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reo Maruyama
2. 発表標題 single-cell chromatin accessibility reveals intra- and inter-tumor heterogeneity in human breast cancer.
3. 学会等名 The 39th Sapporo International Cancer Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯澄人、高橋洋子、楊麗英、糸川昂平、大野真司、上野貴之、丸山玲緒
2. 発表標題 ATAC-seq解析を用いた乳癌の多様性の評価
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 糸川昂平、高橋洋子、佐伯澄人、楊麗英、尾辻和尊、中太智義、大野真司、上野貴之、丸山玲緒.
2. 発表標題 single-cell ATAC-seq解析による乳癌の腫瘍内不均一性評価の試み
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山玲緒、高橋洋子、佐伯澄人、楊麗英、中太智義、大野真司、上野貴之.
2. 発表標題 ATAC-seq解析を用いた乳癌の多様性の評価
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山玲緒
2. 発表標題 乳がん臨床検体のscATAC-seq解析
3. 学会等名 第5回理論免疫学ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山玲緒、高橋洋子、佐伯澄人、楊麗英、宮木理帆、糸川昂平、中太智義、大野真司、上野貴之.
2. 発表標題 scATAC-seq解析を用いた乳癌の多様性評価の試み
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	高橋 洋子  (TAKAHASHI Yoko)  (70383809)	公益財団法人がん研究会・有明病院 乳腺外科・副医長   (72602)	
研究 分担者	中太 智義  (NAKADAI Tomoyoshi)  (10364770)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエビゲノムプロジェクト・研究員   (72602)	

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
---------	---------