

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15562

研究課題名（和文）「DCIS to IDC仮説」の検証とDCIS診断マーカーの探索

研究課題名（英文）Verification of "DCIS to IDC hypothesis" and exploration for DCIS diagnostic markers

研究代表者

中山 淳（Nakayama, Jun）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員（特別研究員PD）

研究者番号：30801237

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、非浸潤性乳管がん（Ductal Carcinoma in situ, DCIS）検体に対する scRNA-seq解析を行うことで、DCIS組織中の不均一性を明らかにし、浸潤性乳管がん（IDC）への移行に重要ながん細胞集団や遺伝子を同定した。加えて、「DCIS to IDC仮説」の検証を行った。その結果、DCISに特徴的な遺伝子をシングルセルレベルで抽出することに成功した。さらにVARIED法を適用することで、DCIS細胞はIDC細胞と比較して多様性に富む組織であることがわかったことから、DCIS to IDC仮説は不均一進化モデルであることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DCIS検体を用いたscRNA-seqによって、DCIS内のルミナル上皮細胞の多様性を示すことができた。また、今回の結果からDCISの多様性を理解することは、乳がんの進展を理解する上で重要であることが示された。さらに、新たな不均一性解析手法、VARIED法の開発によって、不均一性を定量的に議論することが可能となった。今回の結果から、DCISはIDCとほぼ同等の腫瘍悪性化ポテンシャルを保持しており、ほとんどがんに近い状態であることが示された。過剰治療が問題となっている非浸潤性のDCISだが、実際には浸潤性がん細胞と同様の性質を持つことを考慮して、新たな治療戦略を構築する必要があるだろう。

研究成果の概要（英文）：In breast cancer, 25% of early detection is non-invasive ductal carcinoma in situ (DCIS). This study aimed to identify the expressional heterogeneity and the genes that regulate the transition to invasive ductal carcinoma (IDC) from DCIS tissues by single-cell RNA-seq analysis. Additionally, we developed VARIED analysis, which utilizes quantitative network topology, to reveal the expressional heterogeneity quantitatively for testing the "DCIS to IDC" hypothesis. As a result, genes specifically in DCIS cells were extracted with single-cell resolution. Furthermore, by applying the VARIED method, we identified the expansion of heterogeneity in the stromal populations of IDC. We also identified that DCIS cells were also highly diverse tissues compared to IDC cells, suggesting that the "DCIS to IDC" hypothesis is a heterogeneous evolutionary model. These results were reported in Cancer Research. (Tokura and Nakayama (Co-first) et al., Cancer Res. 2022)

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：scRNA-seq DCIS 浸潤性乳管がん 非浸潤性乳管がん 腫瘍内不均一性 定量的ネットワークトポロジ
- VARIED 乳がん

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

DCIS (Ductal Carcinoma in situ) は、非浸潤性乳管がんである (Cowell et al., Mol Oncol., 2013)。マンモグラフィ検診の普及により、DCIS は新規に診断される乳がんの 20% 以上に増加しており、米国では年間約 5 万例の DCIS が診断されている (American Cancer Society, Breast Cancer Facts & Figures, 2019)。DCIS は非浸潤性のステージ 0 の早期の腫瘍だが、一定の割合で浸潤性の乳がんへと進展する可能性がある。未治療の DCIS のうち、患者が生涯で浸潤性乳がんへ進行すると推定されるのは 40% に過ぎないため、過剰治療が問題となっている (Collins et al., Cancer, 2005)。DCIS から浸潤性乳管がん (Invasive ductal carcinoma, IDC) への進行の分子メカニズムはまだ明らかになっておらず、多くの研究が行われている。観察研究では、腫瘍の大きさ、悪性度、サブタイプ、壊死の有無が DCIS の再発リスクとして報告されている (Parikh et al., American roentgen ray society, 2018)、はっきりとした答えがないのが現状である。また、ゲノム解析の結果、DCIS と IDC では、遺伝子の変異やコピー数異常が類似しており、TP53、PIK3CA、MYC の変異と、1q、8q、11q13、17q12、20q13 の染色体の増加が共通していた (Vargas et al., Breast Cancer Res Treat., 2012; Casasent et al., J Pathol., 2017)。組織検体を用いた RNA シークエンスによる発現解析では、DCIS と IDC において、異なった遺伝子発現パターンが解析されたが、遺伝学的要因は特定されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、single-cell RNA-seq (scRNA-seq) 技術を DCIS 症例と IDC 症例に適用し、1 細胞レベルでその違いを明らかにすることである。1 細胞レベルの遺伝子発現解析により、DCIS 細胞の不均一性を精査し、IDC に至るメカニズムとそのバイオマーカーを同定する。また “DCIS to IDC” 仮説における進化モデルがどのようなものか評価する。

3. 研究の方法

患者情報ならびに腫瘍検体

本研究は、国立がんセンター中央病院の承認を得て実施された研究課題である (2019-018)。すべての患者が、検体の採取および由来する遺伝子情報の解析について、署名入りのインフォームド・コンセントを提供した。全 14 サンプルについてシングルセル RNA シークエンスを行った。2 名の DCIS サンプルの新鮮凍結組織において、空間遺伝子解析を行った。

scRNA-seq 解析

すべての実験サンプルは、10xGenomics 社の Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagents Kits V3.1 User Guide に記載されている実験プロトコルに従った。Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 および Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit を用いた。作製したライブラリに対して次世代シーケンサーを用いて、シーケンズを行い、Read 情報を取得した。シーケンズデータを Cell Ranger パイプライン (Ver3.0.2、10x Genomics) で処理し、ヒトゲノム (GRCh38) にマッピングして、細胞バーコードによる遺伝子数のマトリクスを作成した。正常化、スケールリング、細胞のクラスタリング、クラスタマーカー遺伝子の同定などの scRNA-seq 解析は、R ソフトウェアパッケージ Seurat version 3.2 を用いて行った。nFeature_RNA > 100、percent.mt < 20 のシングルセルを抽出し、ダブレットとデッドセルの除去を行った。

4. 研究成果

(1) DCIS と IDC のシングルセル・トランスクリプトームアトラスの作製

ヒトの乳腺組織 (DCIS 7 例、IDC 6 例、正常組織 1 例) の単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行った (図 1A)。DCIS の中から選ばれた 2 例については、空間遺伝子発現解析を行った。正常な乳腺組織は、乳がん患者の外科的サンプルから病的に正常な組織を用いた。Seurat R パッケージを用いた QC の過程で、死細胞とダブレット細胞と推定された細胞のシーケンズデータを計算上除外し、各サンプルのバッチ効果を減らすために、データを Harmony で統合した。UMAP による教師なしのクラスタリングを行ったところ、29 の異なるクラスタが検出された。細胞種特異的なマーカーの遺伝子発現プロファイルにより、クラスタリング分析で、上皮・間質細胞、増殖性上皮細胞、T 細胞、骨髄系細胞、増殖性免疫細胞、B 細胞、形質細胞、赤血球の 8 つのグループに大別された。DCIS の多様性を解析するために、ルミナル型の上皮細胞のクラスタと増殖性ルミナル細胞のクラスタを用いて、IDC との比較解析を行った。

(2) DCIS から IDC への移行に関連する遺伝子の同定

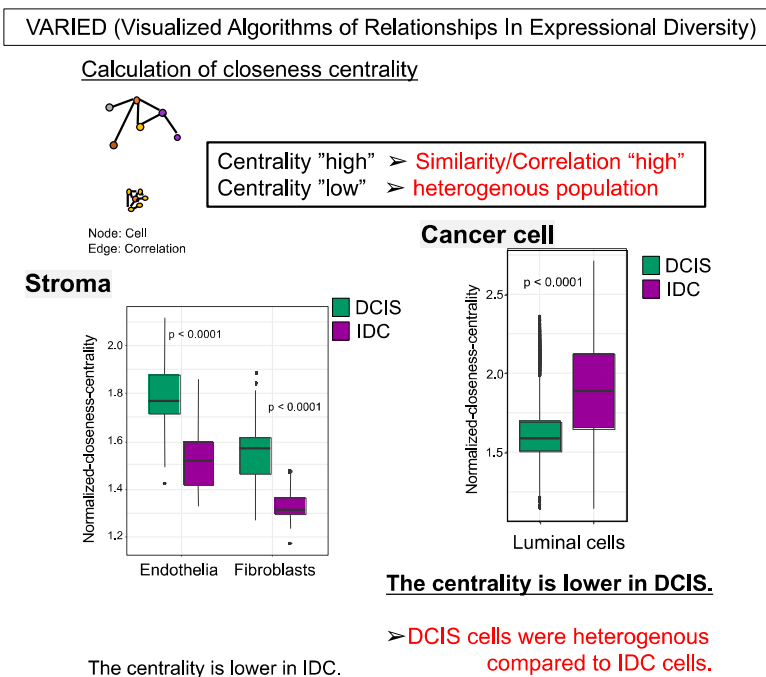
次に、作製した主に IDC 細胞を含むクラスタに注目し、浸潤性を規定する遺伝子の探索を行った。DCIS 細胞と IDC 細胞に特徴的な遺伝子を抽出した結果、RPL17、CFB、CPB1、GABARAP、RNASEK、VIM などの 6 つの遺伝子が、DCIS から IDC に向かって徐々に上昇していることがわか

った。さらに、DCIS や正常乳房では検出されなかった 7 種類遺伝子が、IDC では特異的に発現していることもわかった。これらの候補遺伝子のうち、4 遺伝子はノンコーディング RNA であった。具体例として、RPL17 は、DCIS や正常乳房サンプルでは発現が低く抑えられていたが、IDC では高い発現が認められた。また、IDC では GAS5 の特異的な発現が見られた。しかしながら、上皮間葉移行 (EMT) など制御する主要な浸潤制御遺伝子は、DCIS の時点ですでに発現しており、DCIS はすでに浸潤性ポテンシャルを有する可能性が示唆された。

(3) 遺伝子発現不均一性の定量化手法の開発と DCIS 不均一性評価

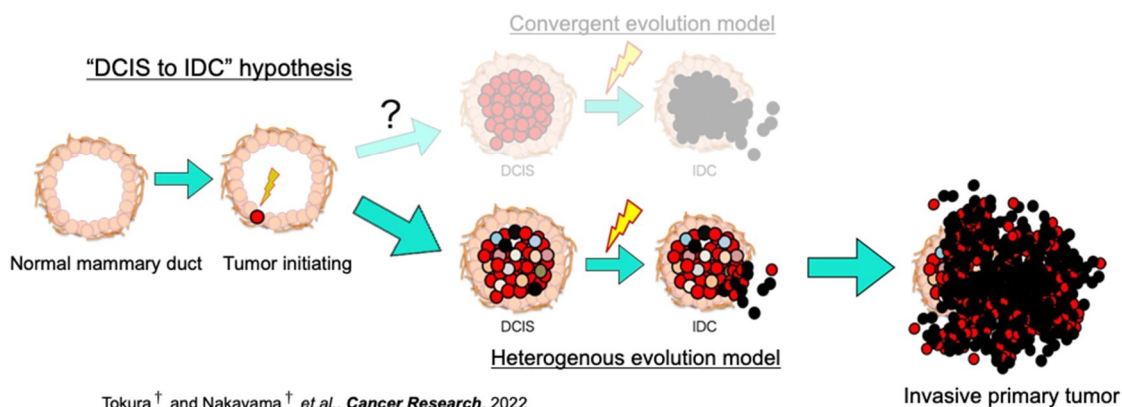
膨大な 1 細胞レベルの遺伝子発現データを細胞類似性ネットワークへ変換し、グラフ構造とトポロジーに着目した解析(中心性解析)を行うことで、細胞集団の多様性を定量化する手法を確立した。本解析手法を Visualized algorithms of relationship in expressional diversity (VARIED) 解析と命名し、これまで不可能であった特定の細胞集団不均一性の定量化評価を可能にした (Tokura† and Nakayama† et al., *Cancer Res.*, 2022; Watanabe†, Fujita†, and Nakayama† et al., *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2022; Nakayama et al., *bioRxiv*, 2021)

その結果、Stroma に分類される血管内皮細胞と線維芽細胞は IDC になることで遺伝子発現不均一性が拡大することがわかった。しかしながら、非常に興味深いことに、DCIS 細胞は IDC 細胞よりも不均一な集団であることが示された。すなわち、非浸潤性である DCIS の段階でクローン拡大が完了し、すでに不均一な集団であることが示された。



DCIS to IDC hypothesis : Heterogenous evolution model

Our results supported the heterogenous evolution model in "DCIS to IDC" hypothesis.



これらの結果から、DCIS はすでに IDC と同等の悪性化ポテンシャルを持ち、かつ、不均一な集団であることが示された。私達の結果は、DCIS to IDC 仮説は不均一進化モデルを示唆するものであった。

Tokura† and Nakayama† et al., *Cancer Research*, 2022 †Co-first author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 23
2. 論文標題 Aberrant accumulation of NIK promotes tumor growth by dysregulating translation and post-translational modifications in breast cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Cell International	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/s12935-023-02904-y	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 Azuma Kazushi, Sakamoto Mai, Katayama Shota, Matsui Atsuka, Nakamichi Kazuya, Goshima Naoki, Watanabe Shinya, Nakayama Jun, Semba Kentaro	4. 巻 28
2. 論文標題 HOXB7 induces STAT3 mediated transformation and lung metastasis in immortalized mammary gland NMuMG cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 277 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13009	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 Watanabe Naoaki, Fujita Yu, Nakayama Jun, Mori Yutaro, Kadota Tsukasa, Hayashi Yusuke, Shimomura Iwao, Ohtsuka Takashi, Okamoto Koji, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi, Yamamoto Yusuke	4. 巻 67
2. 論文標題 Anomalous Epithelial Variations and Ectopic Inflammatory Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2021-0555oc	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 Tokura Momoko, Nakayama Jun, Prieto-Vila Marta, Shiino Sho, Yoshida Masayuki, Yamamoto Tomofumi, Watanabe Naoaki, Takayama Shin, Suzuki Yutaka, Okamoto Koji, Ochiya Takahiro, Kohno Takashi, Yatabe Yasushi, Suto Akihiko, Yamamoto Yusuke	4. 巻 82
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals Intratumoral Heterogeneity and Molecular Features of Ductal Carcinoma In Situ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3236 ~ 3248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.can-22-0090	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 Nakayama Jun, Matsunaga Hiroko, Arikawa Koji, Yoda Takuya, Hosokawa Masahito, Takeyama Haruko, Yamamoto Yusuke, Semba Kentaro	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of two cancer stem cell-like populations in triple-negative breast cancer xenografts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	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) 10.1242/dmm.049538	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 Han Yuxuan, Azuma Kazushi, Watanabe Shinya, Semba Kentaro, Nakayama Jun	4. 巻 -
2. 論文標題 Metastatic profiling of HER2-positive breast cancer cell lines in xenograft models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	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) 10.1007/s10585-022-10150-1	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 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 公共データベースを利用した1細胞メタ解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山淳, 山本雄介
2. 発表標題 遺伝子発現不均一性を定量化するVARIED解析手法の開発
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」2022年度成果発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山淳, 山本雄介
2. 発表標題 1細胞解析が明らかにする喫煙肺の細胞・遺伝子発現多様性
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介
2. 発表標題 乳がんにおけるがん幹細胞様集団の腫瘍内不均一性
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 野生型FLT3を標的とした新規シース化合物の創製と評価
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東和志, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いたNMuMG-HOXB7細胞の転移能評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山元智史, 森屋亮平, 中山淳, 落谷孝広, 山本雄介
2. 発表標題 野生型FLT3陽性多発性骨髄腫に対する新規阻害剤の合成
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野悠太, 中山淳, 山元智史, 藤田雄, 山本雄介
2. 発表標題 単一細胞発現解析による肺癌の腫瘍微小環境の比較解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 椎野翔, 中山淳, 都倉桃子, 山本雄介, 吉田正行
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing解析を用いたHER2陽性乳癌の腫瘍内遺伝子発現差異解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都倉桃子, 中山淳, プリエトピラ マルタ, 椎野翔, 吉田正行, 山本雄介
2. 発表標題 シングルセルRNAシーケンスによるDCISの腫瘍内不均一性と分子的特徴の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤景紀, 山元智史, 佐藤峻, 中山淳, 島崎猛夫, 占部文彦, 木村高弘, 穎川晋, 落谷孝広, 山本雄介
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションにおける造骨性前立腺癌骨転移メカニズムの解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口かれん, 山元智史, 中山淳, 山本雄介
2. 発表標題 HPLMを用いた培養条件下での口腔癌細胞株の分子生物学的比較
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuxuan Han, 中山淳, 二口充, 伊藤恵美, 渡辺慎哉, 仙波憲太郎
2. 発表標題 溶骨性luminal乳がん細胞株の性状解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒岩由佳, 伊藤景紀, 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介
2. 発表標題 乳がんにおけるアンドロゲン応答性の解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介
2. 発表標題 Cell-in-Cell現象に着目した乳がん細胞株の性状解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東和志, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いたNMuMG-HOXB7細胞の転移能評価
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」2022年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山元智史, 中山淳, 落谷孝広, 山本雄介
2. 発表標題 セリン代謝異常によるがん細胞特異的な細胞外小胞分泌の誘導とがん転移の亢進
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」2022年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山元智史, 中山淳, 山本雄介, 落谷孝広
2. 発表標題 セリン代謝亢進による細胞外小胞の分泌異常と乳がん転移機構
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中道和也, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 HIF1標的遺伝子によるがん再分類の検討
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東和志, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いたNMuMG-HOXB7細胞の転移能評価
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東和志, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いたNMuMG-HOXB7細胞の転移能評価
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山元智史, 森屋亮平, 中山淳, 伊集院良祐, 青山洋史, 山本雄介
2. 発表標題 FLT3陽性多発性骨髄腫を標的とした新規抗がん剤の合成と探索
3. 学会等名 第47回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都倉桃子, 中山淳, 椎野翔, 首藤昭彦, 吉田正行, 山本雄介
2. 発表標題 Single cell RNA sequencingを用いた乳癌の腫瘍内不均一性と浸潤に伴う分子メカニズムの解明
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 椎野翔, 中山淳, 都倉桃子, 渡瀬智佳史, 神保健二郎, 首藤昭彦, 吉田正行, 山本雄介
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing法を用いた乳癌の腫瘍内遺伝子発現の差異に関する検討
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 プリエトピラ マルタ, 中山淳, 薄場渉, 小島康幸, 吉田正行, 落谷孝広, 山本雄介
2. 発表標題 原発腫瘍の転移性乳がん細胞遺伝子プロファイルにおける単一細胞発現解析
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 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介
2. 発表標題 乳がん同所性移植モデルにおける腫瘍内微小不均一性の解析
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
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
研究協力者	山本 雄介 (Yamamoto Yusuke) (60768117)		
研究協力者	仙波 憲太郎 (Semba Kentaro) (70206663)		
研究協力者	落谷 孝広 (Ochiya Takahiro) (60192530)		
研究協力者	プリエトピラ マルタ (PrietoVila Marta) (40804646)		
研究協力者	山元 智史 (Yamamoto Tomofumi) (40963369)		
研究協力者	鈴木 穰 (Suzuki Yutaka) (40323646)		
研究協力者	岡本 康司 (Okamoto Koji) (80342913)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	河野 隆志 (Kohno Takashi) (80280783)		
研究協力者	谷田部 恭 (Yatabe Yasushi) (90280809)		
研究協力者	椎野 翔 (Shiino Sho) (60784527)		

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