

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08572

研究課題名（和文）1細胞解析法による乳癌内分泌療法抵抗性の解明-血中循環腫瘍細胞からのアプローチ

研究課題名（英文）Elucidation of Breast Cancer Endocrine Therapy Resistance by Single Cell Analysis using Blood Circulating Tumor Cells

研究代表者

山本 滋（Yamamoto, Shigeru）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30289178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：シングルセル次世代シーケンス技術を検討しQuartz-seq法を用いることでシングルセルから8000遺伝子の発現解析が可能になった。そこで、ソーターで分離したCTCをシングルセルRNA-seq解析を行ったが、100前後の遺伝子しか検出されず、セルソーターを用いることでRNAの分解が促進されていた。このため、レーザー設定を変更し、細胞への損傷が少ないセルソーターで術後の乳がん組織から分離した細胞から生細胞だけを分離精製した。その結果、1細胞から8000前後の遺伝子が検出され、白血球の混入などが詳細に解析出来るようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンレセプター(ER⁺)陽性/HER-2陰性の転移・再発乳癌は、内分泌療法に対しほとんどの症例で治療抵抗性を獲得しており、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。原発巣から血流に流入した乳癌細胞は、転移再発までの抵抗性獲得時点でのリアルタイムスナップショットとみなすことができる。このため再発患者の血中循環腫瘍細胞（CTC）の全遺伝子を網羅的に解析し、初回手術時の原発巣の変異と比較検討し遺伝子変動を正確に把握することが最も重要である。

研究成果の概要（英文）：We investigated single-cell next-generation sequencing technology and found that the Quartz-seq method enabled us to analyze the expression of 8000 genes from a single cell. Therefore, we performed single-cell RNA-seq analysis of CTCs isolated by the sorter, but only about 100 genes were detected, and RNA degradation was accelerated by using the cell sorter. Therefore, the laser setting was changed and only viable cells were isolated and purified from cells isolated from postoperative breast cancer tissues using a cell sorter with less damage to the cells. As a result, around 8,000 genes were detected from a single cell, allowing for detailed analysis of leukocyte contamination.

研究分野：乳癌外科

キーワード：CTC 乳癌 RNA-seq シングルセル

1. 研究開始当初の背景

近年、先進国の中で日本だけが急増している乳癌は、特に若年層において顕著であり、子育てや就業など多くの面で深刻な問題を引き起している。このため乳癌の原因を解明するとともに早急に治療法の確立が求められる。乳癌のサブタイプの一つである ER 陽性乳癌は、全乳癌の約 70% を占める。ER は、女性ホルモン(エストロゲン)によって活性化される核内受容体で、ホルモン依存性乳癌の進行に深く関与する。転移・再発をきたした ER 陽性乳癌の内分泌療法剤に対する感受性や、耐性機序には不明な点が多い。実臨床では、内分泌療法に治療効果がみられたとしても必ずや内分泌療法抵抗性を獲得し、さらなる転移巣を形成し、患者を死に至らしめる。学術的「問い」は、転移・再発 ER 陽性乳癌患者の血液中を循環する癌細胞は、内分泌療法の治療過程で、何らかの ER の発現上昇に関与する遺伝子群の体細胞変異がおこり、結果的に ER の発現が変化(増強?抑制?)し内分泌療法剤に抵抗性を獲得しているのではないか?である。これまでに我々は、乳癌において次世代シーケンサーを用いて 40 症例以上で全エクソン解析を行い、ターゲットリシーケンス次世代シーケンス法で検証し 326 遺伝子で新規遺伝子変異を解明した。これらの新規体細胞変異からパスウェイ解析を駆使し転写抑制因子の異常による ER 発現調節メカニズムを明らかにした(日本分子生物学会発表済)。現在、1細胞解析技術の検討を行い、多くの試薬キット等を検討した結果、locked オリゴを用いた微量 DNA 増幅後、全エクソン領域のマルチプレックス PCR を組み合わせることで、1細胞レベルでの遺伝子解析が初めて可能になった。エストロゲンレセプター(ER)陽性/HER-2 陰性の転移・再発乳癌は、内分泌療法に対しほとんどの症例で治療抵抗性を獲得しており、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。原発巣から血流に流入した乳癌細胞は、転移再発までの抵抗性獲得時点でのリアルタイムスナップショットとみなすことができる。我々は、これまで 40 症例以上の原発乳癌の全エクソン領域の次世代シーケンス解析を実施してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内分泌療法に抵抗性となった転移・再発乳癌患者を対象に、全身転移のシードである血中循環腫瘍細胞(CTC)に1細胞解析技術を用いて、我々の先行研究(乳癌原発巣)で見出した ER 発現上昇に関与する体細胞変異を検討することで、内分泌療法抵抗性獲得に関わる遺伝子変異を解明し、内分泌療法抵抗性乳癌の新規治療戦略を示すことである。内分泌療法抵抗性を獲得した ER 陽性乳癌のバイオロジーの解明は非常に重要な課題であるが、これまでの培養細胞では 2 次的に遺伝子変異が多数導入され治療には直結していない。また循環腫瘍 DNA(ctDNA)は、原発巣および転移巣からアポトーシス、壊死および分泌のいずれかで放出された血漿中の変異 DNA 断片で、癌診断マーカーとしての検討が行われているものの、リアルタイムに転移に関与している細胞に由来するものではない。その点で、CTC は腫瘍組織から離脱して血中に流入した状態の細胞であるため、内分泌療法抵抗性乳癌患者において、本当の意味での内分泌療法抵抗性に直結した腫瘍細胞である。これらの細胞では個人間の遺伝子差による SNP と変異を区別することが難しかった。我々は、原発乳癌組織と正常全血液の全エクソン遺伝子解析を完了しており、SNP を明確に除外することができる。また、これまでの1細胞増幅技術では、増えやすい領域だけが増幅する増幅ムラや目的以外の遺伝子が認められ細胞プロファイルしか解明できなかった。我々は、1細胞内でゲノムを微量増幅後に DNA を再精製し、全エクソン領域を増

幅させる多段階増幅技術を確立し正確にゲノム DNA を増幅させることに成功している。

3 . 研究の方法

本研究では、独自に開発した 1 細胞全ゲノム増幅法を用いて、次世代シーケンサーによる CTC のゲノムエクソーム解析を行い、体細胞変異を同定し変異遺伝子発現細胞を用いて転移・再発乳癌を再現し分子標的治療の候補分子を解明する。

(1)1 細胞 (CTC) の単離

内分泌療法に抵抗性となった転移乳癌患者 20 人の血液検体より CTC を採取する。濃縮過程では CTC が血球細胞より細胞径が大きいことを利用した物理学的手法として、CTC を血液中から簡便・効率的に回収するフィルターキット (ScreenCell®) を用いる。フィルター上部に全血を添加した状態でフィルター下部に真空採血管をセットすると、血液がフィルターを通して真空採血管に引っ張られ、その過程で CTC がフィルター上に捕集される。回収した細胞を、PCR やシーケンスなどの遺伝子的解析に使用するため、ゲノム DNA を抽出する。抗体を使用しないため、抗体のターゲットとなる EpCAM の発現がほとんどない EMT 化した細胞も捕集可能と思われる。

(2)1 細胞全ゲノムの増幅 (Whole genome amplification: WGA)

シングルセルからでも全ゲノム増幅は多くのキットが販売されているが、特定の領域だけ増幅されたり次世代シーケンス解析が出来るだけの DNA を増幅できる試薬はほとんどない。我々はシリコンバイオシステムのキットでゲノムが均一に増幅できることを確認した。その後、全エクソン領域をマルチプレックス PCR で増幅し、多段階 PCR で次世代シーケンスの解析に必要な DNA 量を確保できた。

(3)次世代シーケンシングによる 1 細胞 DNA 配列エクソーム解析

内分泌療法抵抗性乳癌患者の CTC の 1 細胞ゲノム解析を行い、原発巣と変異を比較することで、ER 発現に関与する遺伝子に、どのような変異をもった細胞が、内分泌療法抵抗性の獲得、さらに内分泌療法抵抗性の乳癌細胞集団として転移に関わっているかを解析する。

1 細胞から増幅されたエクソン領域 DNA を 200bp 前後に断片化した後、DNA の両端に細胞を区別するため、バーコード配列を導入し各細胞毎の DNA ライブラリーを作成する。

20 細胞毎に Next-seq (現有) で次世代シーケンス解析を行う。配列情報の解析は、現有する CLC-bio 社製ソフトウェア Genomics Workbench を用い体細胞変異、挿入、重複を検出する。その後、既知の SNP や、患者血液ゲノム DNA において検出された SNP を除外する。検出された変異を患者自身の原発癌の変異と比較し、転移がん組織中の体細胞変異を IonS5 (現有) によるターゲットリシーケンス法で確認する。我々は、これまで 5 台の次世代シーケンサーを使い、年間 500 サンプル以上の次世代シーケンス解析を行っており十分な実績を有している

4 . 研究成果

シングルセル次世代シーケンス技術を検討し Quartz-seq 法を用いることでシングルセルから 8000 遺伝子の発現解析が可能になった。そこで、ソーターで分離した CTC をシングルセル RNA-seq 解析を行ったが、100 前後の遺伝子しか検出されず、セルソーターを用いることで RNA の分

解が促進されていた。このため、レーザー設定を変更し、細胞への損傷が少ないセルソーターで術後の乳がん組織から分離した細胞から生細胞だけを分離精製した。その結果、一細胞から 8000 前後の遺伝子が検出され、白血球の混入などが詳細に解析出来るようになった。

術後のサンプルによっては、全く生細胞が存在しないケースもあり、細胞を処理する過程で問題がないか検証している。安定的に解析するためには、核を分離し核内の RNA を解析する方法への変更を検討している。

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 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Harada Koji, Takenawa Takanori, Ferdous Tarannum, Mizukami Yoichi, Mishima Katsuaki | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Elemental diet directly affects chemotherapy induced dermatitis and raw wound areas | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology | 6. 最初と最後の頁 209 ~ 215 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2050 | 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 Kohno Michiaki, Kobayashi Shigeki, Yamamoto Takeshi, Yoshitomi Ryosuke, Kajii Toshiro, Fujii Shohei, Nakamura Yoshihide, Kato Takayoshi, Uchinomi Hitoshi, Oda Tetsuro, Okuda Shinichi, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Yano Masafumi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 1-15 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01443-w | 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 Isayama Keishiro, Watanabe Kenji, Okamoto Mariko, Murata Tomoaki, Mizukami Yoichi | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Standardization of an LNA-based TaqMan assay qPCR analysis for Aspiculuris tetraptera DNA in mouse faeces | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC Microbiology | 6. 最初と最後の頁 1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-020-02053-6 | 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 Matsumura Takuro, Ohta Yasuharu, Taguchi Akihiko, Hiroshige Syunsuke, Kajimura Yasuko, Fukuda Naofumi, Yamamoto Kaoru, Nakabayashi Hiroko, Fujimoto Ruriko, Yanai Akie, Shinoda Koh, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Kanki Keita, Shiota Goshi, Tanizawa Yukio | 4. 巻 534 |
| 2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 415 ~ 421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.066 | 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 Harada Koji, Ferdous Tarannum, Watanabe Kenji, Mizukami Yoichi, Mishima Katsuaki | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Effects of an elemental diet, Elental, may differ between healthy oral cells and oral cancer cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 738 ~ 751 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7896 | 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 Yamauchi Akihiro, Tone Takahiro, Sugimoto Koji, Seok Lim Hong, Kaku Taiichi, Tohda Chihiro, Shindo Takayuki, Tamada Koji, Mizukami Yoichi, Hirano Eiichi | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Porcine placental extract facilitates memory and learning in aged mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Food Science & Nutrition | 6. 最初と最後の頁 2995 ~ 3005 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.1156 | 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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 諫山 慧士朗、渡邊健司、村田智昭、水上洋一 |
| 2. 発表標題 糞便における迅速で高感度なネズミ大腸ギョウチュウ検査法の開発 |
| 3. 学会等名 第61回日本生化学会中国四国支部会2020年7月13日広島大学主催 リモート会議 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、坂口 修一、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一 |
| 2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNAの体細胞変異は自然免疫受容体パスウェイを活性化する |
| 3. 学会等名 第61回日本生化学会中国四国支部会2020年7月13日広島大学主催 リモート会議 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井上幸江、伊豫田拓也、沖田直之、宮本崇文、水上洋一、赤木玲子 |
| 2. 発表標題 ヒト白血病細胞株HL60の分化に伴うヘムオキシゲナーゼ-1誘導変化 |
| 3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (2020.12/2-4、神戸) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、坂口 修一、八木 美佳子、康 東天、岡 正朗、永野浩昭、水上 洋一 |
| 2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNA体細胞変異発現細胞の全転写産物解析 |
| 3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 (2020.12/2-4、神戸) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水上洋一 |
| 2. 発表標題 中国地区バイオネットワーク会議のご紹介 |
| 3. 学会等名 第23回 九州山口機器分析会議(佐賀大学主催 リモート会議)2020年11月27日 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水上 洋一 |
| 2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた解析事例 |
| 3. 学会等名 山口大学大学研究推進機構年次セミナー(2020年12月11日) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、坂口 修一、岡 正朗、永野 浩昭、水上 洋一 |
| 2. 発表標題 転写抑制因子SIN3A変異体の核外移行はエストロゲン受容体発現上昇を介して乳がん細胞の増殖を促進する |
| 3. 学会等名 山口大学生命医工学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 諫山慧士朗、渡邊健司、村田智昭、 大塚正人、 水上洋一 |
| 2. 発表標題 加齢卵巢の低排卵応答に関連する遺伝子ネットワーク |
| 3. 学会等名 山口大学生命医工学シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 諫山慧士朗、渡邊健司、坂口 修一、大塚正人、 水上洋一 |
| 2. 発表標題 次世代シーケンスとGONAD法を用いた卵巢老化における排卵機能低下の原因遺伝子の解明 |
| 3. 学会等名 第60回 日本生化学会中国四国支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、坂口 修一、岡 正朗、水上 洋一 |
| 2. 発表標題 乳癌患者から検出したミトコンドリアDNAの体細胞変異は乳がん細胞の増殖を促進する |
| 3. 学会等名 第60回 日本生化学会中国四国支部例会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡邊 健司、山本 滋、前田 訓子、坂口 修一、岡 正朗、永野 浩昭、水上 洋一 |
| 2. 発表標題 Cancer hot spot panel を用いた乳がん組織gDNAのがん遺伝子ホットスポット領域における変異の検出 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 水上洋一 |
| 2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた疾患原因遺伝子の解明 |
| 3. 学会等名 第2回 山口東京理科大 病態生化学セミナー |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水上洋一、諫山慧士朗、渡邊 健司 |
| 2. 発表標題 糞便における迅速で精度の高いネズミ大腸ギョウチュウ検査法の開発 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 |
| 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 |
|---------------|---|------------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 前田 訓子 (Maeda Noriko) (10738876) | 山口大学・医学部附属病院・助教 (15501) | |

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 分 担 者 | 水上 洋一 (Mizukami Yoichi) (80274158) | 山口大学・大学研究推進機構・教授 (15501) | |
| 研究 分 担 者 | 佐藤 陽子 (Sato Yoko) (70794676) | 山口大学・医学部附属病院・診療助教（4日/週） (15501) | |

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 |
|---------|---------|
| | |