

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16269

研究課題名（和文）ERBB2アンプリコンが制御する乳癌多臓器転移の分子機序解明

研究課題名（英文）Multi-Organ Metastasis of Breast Cancer Regulated by ERBB2-Amplicon

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ERBB2(HER2)の遺伝子増幅は癌の診断・治療標的として重要視されてきたが、ERBB2近傍の50にもおよぶ遺伝子群も共に遺伝子増幅されることの意義はほとんど明らかになっていなかった。本研究の成果として、ERBB2アンプリコン辺縁部に位置するHNF1Bは複数の臓器への転移を誘導する乳癌多臓器転移の責任遺伝子であることが明らかになった。また、転移組織より単離培養した腫瘍細胞のRNA-seq解析より、細胞をマウス乳房に同所移植した時点で、顕著なin vivoセレクションが起きていることが明らかになった。さらに、原発巣、転移巣それぞれに特徴的に発現する遺伝子を抽出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌におけるがん遺伝子であるERBB2（HER2）は遺伝子増幅によって遺伝子のコピー数が増大している。このERBB2の遺伝子増幅は癌の診断・治療標的として重要視されてきたが、ERBB2近傍の50にもおよぶ遺伝子群も共に遺伝子増幅されることの意義はほとんど明らかになっていない。ERBB2アンプリコン（17q12.21）に含まれる遺伝子が乳癌遠隔転移においてどのような役割をもつか明らかにすることで、乳癌におけるアンプリコン領域長の治療・診断への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Gene Amplification of ERBB2(HER2) is important as a diagnostic and therapeutic target for cancer. However, the implication of co-amplification of ERBB2 neighbor 50 genes remains unclear.

As a result of this study, HNF1B, located at the margin of ERBB2 amplicon, induced multi-organ metastasis in breast cancer. In addition, RNA-seq analysis of tumor cells isolated from metastatic tissue revealed that in vivo selection occurred when the cells were transplanted into the mammary fatpad. Furthermore, we succeeded in extracting genes that are characteristically expressed in each of the primary and metastatic lesions.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ERBB2 乳癌 遺伝子増幅 がん転移 多臓器転移 ホメオボックス遺伝子 アンプリコン HER2陽性乳がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ERBB2 (HER2) の遺伝子増幅は癌の診断・治療標的として重要視されてきたが、ERBB2 近傍の 50 にもおよぶ遺伝子群も共に遺伝子増幅されることの意義はほとんど明らかになっていない。これまでの研究成果から、ERBB2 と共に遺伝子増幅する遺伝子の中に、HER2 陽性乳癌において脳・肺・骨などの多臓器転移を誘導する遺伝子で存在する結果を得たことに着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ERBB2 アンプレコン (17q12.21) に含まれるホメオボックス遺伝子 HNF1B がどのようなシグナル伝達経路や下流因子を介して、HER2 陽性乳癌の遠隔転移を亢進するのかを明らかにすることである。網羅的な下流因子探索として、次世代シーケンサーを用いた HNF1B 転移組織における遺伝子発現解析を行い、各転移組織に特徴的な HNF1B 下流遺伝子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) NMuMG-ERBB2V659E 細胞を用いた HNF1B の機能解析

活性型 ERBB2 を発現させた正常乳腺上皮細胞株 NMuMG を用いた転移評価系を行い、HNF1B の転移能を明らかにする。マウス乳腺脂肪組織中に移植する同所性移植手法 (原発巣形成、全身転移の評価)、尾静脈注射手法 (肺転移の評価)、尾動脈注射手法 (骨転移の評価)、頭蓋内移植手法 (脳転移の評価) を行った。

またこれら転移巣から腫瘍細胞を単離培養し、HNF1B 転移指向性細胞を複数樹立した。この転移細胞に対する RNA-seq 解析を行うことで、HNF1B の下流遺伝子を同定する。

#### (2) HNF1B 転移巣由来腫瘍細胞の樹立と網羅的遺伝子発現解析

得られた転移細胞から RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。Kallisto/Tximport を用いて遺伝子発現量を定量化し、DESeq2 による DEGs (Differential Expression Genes) の抽出を行った。

### 4. 研究成果

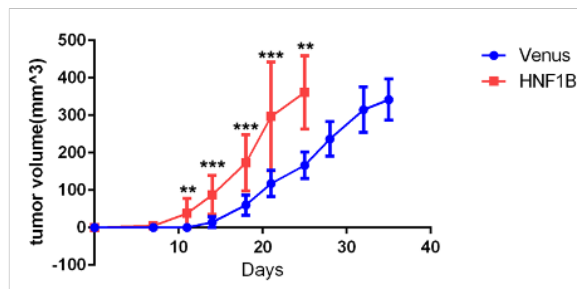
#### (1) NMuMG-ERBB2V659E 細胞を用いた HNF1B の機能解析

まず造腫瘍能を評価した結果から、HNF1B 発現細胞は原発部位における顕著な造腫瘍能の増大が確認された。HNF1B を単独で発現させただけで腫瘍形成に至ることはないが、ERBB2 などのがん遺伝子でトランスフォームされた細胞においては、造腫瘍能を促進することが明らかになった。次に、活性型 ERBB2 のみを発現させた細胞は肺転移しか起こさなかったことに対し、HNF1B 発現細胞は肺・骨・脳への転移を引き起こすことがわかった。

以上の動物実験の結果から、ERBB2 アンプレコン辺縁部に位置する HNF1B は複数の臓器への転移を誘導する乳癌多臓器転移の責任遺伝子であることが明らかになった。

#### Orthotopic transplantation

Cell: NMuMG-ERBB2V659E



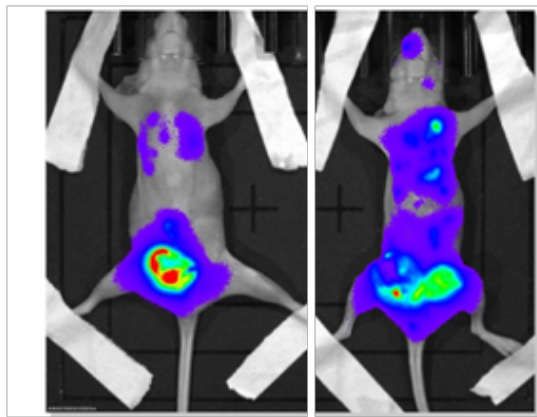
Venus



HNF1B

Cell: NMuMG-ERBB2V659E

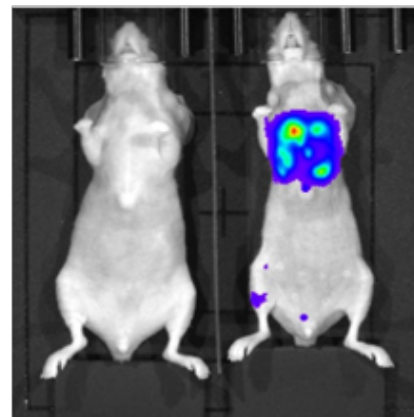
Orthotopic transplantation



Venus

HNF1B

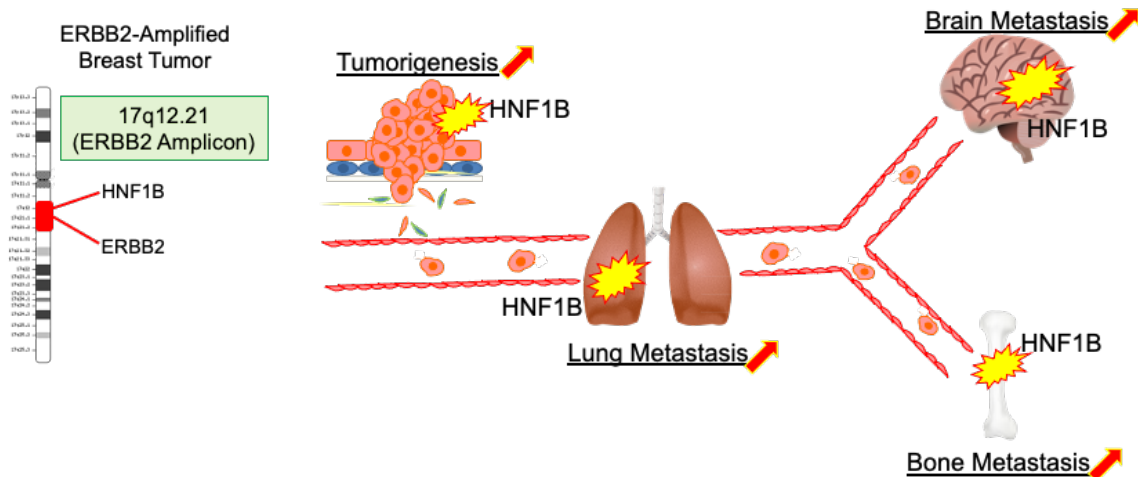
Tail Vein Injection



Venus

HNF1B

これらの動物実験により作製した転移巣から、腫瘍細胞を単離培養し、HNF1B 原発腫瘍、HNF1B 肺転移、HNF1B 骨転移、HNF1B 脳転移細胞をそれぞれ樹立した。興味深いことに、脳転移から樹立した細胞は、プラスチックディッシュ上で特徴的な突起をもつ細胞形態を示しことがわかった。この特徴的な突起構造は、他の細胞では観察されなかった。脳微小環境は細胞増殖の足場もほとんどなく、乳がん細胞にとっては過酷な増殖環境でもあることから、突起伸長の細胞形態変化を獲得したことは非常に興味深い結果である。



## (2) HNF1B 転移巣由来腫瘍細胞の樹立と網羅的遺伝子発現解析

単離培養・樹立した転移細胞および腫瘍細胞22種に対して、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析を行った。Kallisto-Tximportを用いた遺伝子発現の定量化と比較解析の結果から、細胞をマウスの乳房に移植した時点で、顕著な *in vivo* セレクションが起きていることが明らかになった。さらに、移植前の親株、原発巣、転移巣それぞれに特徴的に発現する遺伝子を抽出することに成功した。

これらの成果に関連して、尾動脈注射手法による *in vivo* セレクション法と新規溶骨性乳がん細胞株の樹立 (Han and Nakayama *et al.*, *Genes Cells*, 2020) HER2 陽性乳がん細胞株における脳転移能の評価 (Kuroiwa *et al.*, *Cancers*, 2020)、新規ルシフェリンアナログを用いた乳がん転移イメージング技術の開発 (Nakayama and Saito *et al.*, *Int J Mol Sci.*, 2020)、乳がんの発がんにおける 17q12.23 アンプリコンに位置するホメオボックス遺伝子の機能解析 (Sakamoto *et al.*, *bioRxiv*, 2021) を報告した。さらに、乳がんにおける *in vivo* セレクション法・高転移株の樹立、転移メカニズムに関する総説 (Nakayama *et al.*, *Int J Mol Sci.*, 2021) を執筆した。本研究成果については現在投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuroiwa Yuka, Nakayama Jun, Adachi Chihiro, Inoue Takafumi, Watanabe Shinya, Semba Kentaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Proliferative Classification of Intracranially Injected HER2-positive Breast Cancer Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1811 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12071811	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 Nakayama Jun, Saito Ryohei, Hayashi Yusuke, Kitada Nobuo, Tamaki Shota, Han Yuxuan, Semba Kentaro, Maki Shojiro A.	4. 巻 21
2. 論文標題 High Sensitivity In Vivo Imaging of Cancer Metastasis Using a Near-Infrared Luciferin Analogue selmpai	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7896 ~ 7896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217896	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 Nakayama Jun, Han Yuxuan, Kuroiwa Yuka, Azuma Kazushi, Yamamoto Yusuke, Semba Kentaro	4. 巻 22
2. 論文標題 The In Vivo Selection Method in Breast Cancer Metastasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1886 ~ 1886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041886	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 Y, Nakayama J, Hayashi Y, Jeong S, Futakuchi M, Ito E, Watanabe S and Semba K	4. 巻 25(2)
2. 論文標題 Establishment and characterization of highly osteolytic luminal breast cancer cell lines by intra-caudal arterial injection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 111-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12743	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 Sakamoto Mai、Nakayama Jun、Matsui Atsuka、Fujimoto Jiro、Goshima Naoki、Watanabe Shinya、Semba Kentaro	4. 巻 2021.05.16.444388
2. 論文標題 HOXB7 induces oncogenic transformation in NMuMG cells via JAK2-STAT3 signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.05.16.444388	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30件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒岩由佳, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 頭蓋内移植手法によるHER2陽性乳がんの脳組織中における増殖能の評価
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuxuan Han, 中山淳, 林祐介, 二口充, 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29回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩由佳, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 頭蓋内移植手法によるHER2陽性乳がん細胞株の脳転移能の解析
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩由佳, 中山淳, 山本雄介, 仙波憲太郎
2. 発表標題 頭蓋内移植手法によるHER2陽性乳がん細胞株の増殖分類
3. 学会等名 2020年度文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒岩由佳, 中山淳, 山本雄介, 渡辺慎哉, 仙波憲太郎
2. 発表標題 脳組織中における増殖能に基づくHER2陽性乳がん細胞株の分類
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 林祐介, 中山淳, 山本瑞生, 山本雄介, 井上純一郎, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析
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 Yuxuan Han, Jun Nakayama, Yusuke Hayashi, Seongmoon Jeong, Mitsuru Futakuchi, Emi Ito, Shinya Watanabe, Kentaro Semba
2. 発表標題 Establishment and Characterization of Luminal High-Osteolytic Breast Cancer Cell Lines Using Intra-Caudal Arterial Injection
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 黒岩由佳, 中山淳, 足立ちひろ, 井上貴文, 山本雄介, 渡辺慎哉, 仙波憲太郎
2. 発表標題 脳組織中での増殖能に基づくHER2陽性乳がん細胞株の分類
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 中山淳, 林祐介, 仙波憲太郎
2. 発表標題 化合物スクリーニングを用いた同所性乳がん肺高転移株の増殖機構解明
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」2019年度成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山淳, 二口充, 仙波憲太郎
2. 発表標題 多臓器転移誘導遺伝子HNF1Bの同定と機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山淳, 二口充, 仙波憲太郎
2. 発表標題 Multi-organ metastasis誘導遺伝子HNF1Bの同定と機能解析
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 新たな高転移株樹立を通じたがん転移研究
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「がん研究の新機軸」(招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 発がん/転移制御遺伝子の同定法
3. 学会等名 理化学研究所生命医科学研究センター IMSセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 同所性乳がん高転移株の樹立とそのトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 愛媛大学プロテオサイエンスセンター PROSセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuxuan Han, Jun Nakayama, Yusuke Hayashi, Seongmoon Jeong, Mitsuru Futakuchi, Emi Ito, Shinya Watanabe and Kentaro Semba
2. 発表標題 Characterization of Luminal High-Osteolytic Breast Cancer Cell Lines
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」2019年度成果発表会
4. 発表年 2020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 尾動脈注射手法を用いた溶骨性Luminal乳がん細胞株の樹立と性状解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒岩由佳, 中山淳, 渡辺慎哉, 仙波憲太郎
2. 発表標題 頭蓋内移植手法によるHER2陽性乳がんの脳転移能の評価
3. 学会等名 In vivoイメージングフォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 山本瑞生, 井上純一郎, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん肺高転移株の性状解析
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」令和元年度若手技術講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林祐介, 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん肺高転移株の性状解析
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山淳, 仙波憲太郎
2. 発表標題 空間トランスクリプトーム解析を用いた腫瘍内微小不均一性の解明
3. 学会等名 「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成30年度成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山淳、伊藤恵美、藤元次郎、渡邊慎哉、仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とそのTranscriptome解析
3. 学会等名 In vivoイメージングフォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山淳、仙波憲太郎
2. 発表標題 腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立
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 中山淳、仙波憲太郎
2. 発表標題 空間トランスクリプトミクス解析技術を用いた腫瘍内微小不均一性の解明
3. 学会等名 「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成30年度若手技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Nakayama, Jiro Fujimoto, Kentaro Semba
2. 発表標題 Establishment and Characterization of highly metastatic breast cancer cell line by orthotopic transplantation
3. 学会等名 Metastasis Research Society 17th Biennial Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山淳、仙波憲太郎
2. 発表標題 腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuxuan Han、中山淳、二口充、仙波憲太郎
2. 発表標題 尾動脈注射手法を用いたLuminal乳がん骨高転移株とその遺伝子発現解析
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山淳、藤元次郎、仙波憲太郎
2. 発表標題 同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とそのTranscriptome解析
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018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	仙波 憲太郎  (Semba Kentaro)  (70206663)		

## 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	二口 充  (Futakuchi Mitsuru)  (60275120)		
研究協力者	渡辺 慎哉  (Watanabe Shinya)  (70251444)		
研究協力者	山本 雄介  (Yamamoto Yusuke)  (60768117)		
研究協力者	伊藤 恵美  (Ito Emi)  (50540796)		
研究協力者	井上 貴文  (Inoue Takafumi)  (10262081)		
研究協力者	森屋(斎藤) 亮平  (Moriya-Saito Ryohei)  (20870801)		
研究協力者	北田 昇雄  (Kitada Nobuo)  (10857022)		
研究協力者	牧 昌次郎  (Maki Shojiro)  (20266349)		

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	足立 ちひろ  (Adachi Chihiro)  (90875402)		

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