

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15563

研究課題名（和文）シングルセル解析を用いた乳癌の腫瘍内不均一性の機序解明と新規治療戦略に関する研究

研究課題名（英文）of intratumoral heterogeneity in breast cancer and novel therapeutic strategies using single cell analysis.

研究代表者

椎野 翔（Shiino, Sho）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：60784527

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）：自施設内で解析したシングル細胞遺伝子発現データと公共データベース内に登録されている各データセットを統合し、HER2陽性乳癌およびLuminal乳癌の腫瘍内不均一性に関する遺伝子発現の調査を行った。クラスター解析において、乳癌関連遺伝子の不均一な分布が確認された。ERBB2高発現群・低発現群において、遺伝子発現レベルが異なる結果であり、ある種のmicroRNAがERBB2発現の上流制御因子として予測された。各症例別のCSCマーカー、EMTマーカー、転移関連マーカーの遺伝子発現は、各症例間で異なった。遺伝子発現の不均一性は、腫瘍内のみならず各患者間においても生じ得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌に対する治療の抵抗性一因として腫瘍内不均一性の形成は重要視されているが、まだその解明と克服には至っていない状況である。HER2陽性乳癌およびLuminal乳癌を対象としたシングル細胞遺伝子発現解析を主体とした本研究において、腫瘍内における遺伝子発現レベルが各細胞間で異なること、さらには症例間でも遺伝子発現の不均一性が認められる可能性が見出された。乳癌の治療にあたる上で、将来的に腫瘍本来の不均一な性質に基づいた治療を展開していく必要があるのみならず、各患者の遺伝子発現の特徴にも応じたテーラーメイド的な治療が将来的に治療抵抗性の克服を考慮する上で必要になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Single-cell gene expression data analyzed within our institution and the respective datasets in public databases were integrated to investigate gene expression for tumor heterogeneity, which contributes to treatment resistance in breast cancer. Cluster analysis identified a heterogeneous distribution of breast cancer-related genes, with different gene expression levels in the ERBB2-high and ERBB2-low expression groups. Moreover, some microRNAs were predicted as upstream regulators of ERBB2 expression. Gene expression levels of CSC (Cancer stem cell) markers, EMT (Epithelial-to-mesenchymal transition) markers and metastasis-related markers differed between each case group. These results suggest that heterogeneity in gene expression may occur not only in the presence or absence of ERBB2 expression and ER status, but also between each patient.

研究分野：乳腺外科

キーワード：乳癌 シングルセル解析 腫瘍内不均一性

1. 研究開始当初の背景

乳癌において、腫瘍内不均一性の形成が治療抵抗性の一因として問題となっているが、詳細な機序は未解明な点が多い。治療抵抗性の癌細胞が生き残り、癌発生の起源とされる癌幹細胞とともに腫瘍内不均一性が形成されることが原因の一つと考えられているが、詳細な機序は未解明のままである。一方、これまでの研究で、腫瘍内や原発巣-転移巣間でサブタイプの不均一性が報告されており臨床的に問題になっていることや、サブタイプ変化において miRNA 発現が関連していることなど新規バイオマーカーの探索が行われている。

single-cell RNA-seq (scRNA-seq) は、各単一細胞における遺伝子発現を調べ、腫瘍の不均一性の理解を助けることを可能とした技術である。本研究では、同技術で遺伝子発現解析を行うことで、サブタイプ間における腫瘍内不均一性の現象に着目し、その形成に関与する新規バイオマーカーの同定を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

シングル細胞遺伝子発現解析技術を用いることで、乳癌において治療抵抗性の一因となる腫瘍内不均一性を調査し、サブタイプ間における腫瘍内不均一性の現象を調査し、さらに同現象に関わる新規バイオマーカーの同定を行う。

3. 研究の方法

自施設内の手術によって得られた乳癌の組織検体を用いたシングル細胞遺伝子発現解析データおよび公共データベース(GEO: The Gene Expression Omnibus database)内に登録されている各データセットを統合し、大規模な乳癌シングル細胞遺伝子発現解析プラットフォームを作成し、より大規模かつ詳細な遺伝子発現データを用いて解析を実施した。Chromium プラットフォーム (10x Genomics, CA, USA) で解析した。さらに、患者の年齢、腫瘍の大きさ、乳がんのサブタイプなどの臨床病理学的情報が公開されているデータセットを使用した。

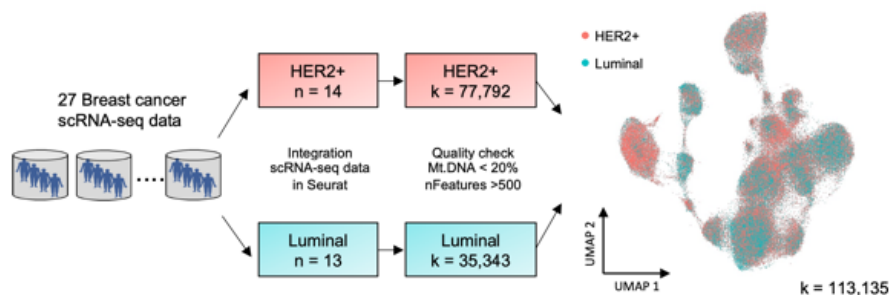
これらのデータセットを R ソフトウェアバージョン 4.2.0 にインポートし、Seurat パッケージバージョン 4.3.0 を用いて Seurat オブジェクトに変換した。その後、異なるデータセットからの Seurat オブジェクトを R で統合した。非線形次元削減法である UMAP を用いてクラスタ分析を行い、クラスタリンググループを特定した。統合されたデータセットを、正規化、スケーリング、スケーリングによる主成分分析 (PCA) にかけた。一般的な UMAP プロット、特徴プロット、バリオリンプロットは R の Seurat で作成した。

4. 研究成果

(1) データ収集

3 つの公開データセット (GSE161529、GSE176078、GSE180286) と独自のデータセット (GSE195861) からなる、14 の HER2(Human epidermal growth factor receptor 2)サブタイプ(HER2 陽性乳癌)と 13 の Luminal サブタイプ(エストロゲン受容体(ER)陽性/HER2 陰性)の scRNA-seq データを統合した。27 の scRNA-seq データセットから合計 113,135 個の単一細胞が得られた (HER2 サブタイプ 14 症例: 77,792 サンプル、luminal 13 症例: 35,343 サンプル)。UMAP プロットを用いて、クラスタリング解析を実施した (図 1)。細胞型特異的マーカーの発現に基づいて、12 の典型的なクラスタに分類され、HER2 サブタイプと luminal サブタイプのいずれにおいても、上皮細胞が細胞集団の多くを占めていた。これら 2 つのサブタイプ間で、細胞分類の各比率に統計的に有意な差はなかった。

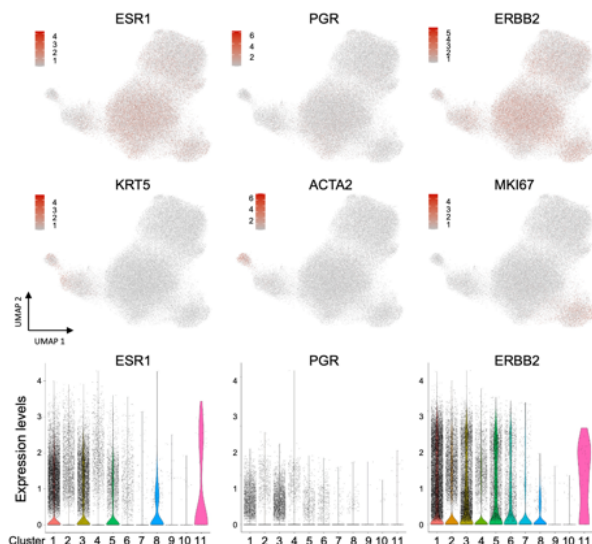
図 1



(2) HER2 および Luminal サブタイプにおける上皮細胞集団の腫瘍内不均一性

特定のマーカー（乳がんマーカーとして ESR1、PGR、ERBB2、基底マーカーとして KRT5、筋上皮マーカーとして ACTA2、増殖マーカーとして MKI67）を用いた UMAP プロットにおいて、ESR1 と ERBB2 の発現は各クラスターにびまん性に分布していたが、その発現値はクラスターごとに異なっていた（図 2）。一方、PGR の発現はほとんどのクラスターで低く、KRT5 と ACTA2 の発現レベルは基本的に低かったが、クラスター 8 では高かった。MKI67 の高発現はクラスター 5 で高発現だった。

図 2



(3) 代表的な乳癌マーカー、CSC マーカー、EMT マーカー、転移関連マーカーの発現レベル

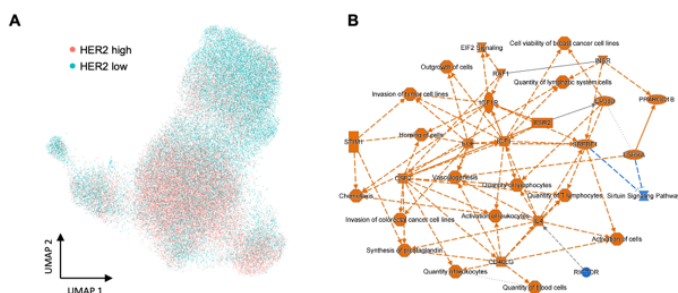
各症例における CSCs(Cancer stem cells)・EMT(Epithelial-to-mesenchymal transition)・転移に関連する代表的な遺伝子の発現を調査したところ、ESR1 と ERBB2 の発現は症例間で大きく異なっていた。EMT マーカーの発現レベル、ESR1 や ERBB2 などの乳癌マーカーの発現、CSCs マーカーは、各症例間で異なる結果であった。

また、ESR1 や ERBB2 などの乳がんマーカーと EMT マーカーとの相関を調べたところ、ERBB2 と TJP1 の発現量の関係は中程度 ($R^2=0.3822$) であったが、ERBB2 と他の EMT マーカーとの相関は低かった。一方、ESR1 の発現量は EMT マーカーと逆相関していた。ESR1 と転写因子の発現は逆相関していたが、HER2 陽性乳癌では ERBB2 と転写因子の発現は相関していなかった。これらのデータから、ESR1 は EMT プロセスを負に制御するが、ERBB2 は制御しないことが示唆された。

(4) ERBB2 高発現群と ERBB2 低発現群の遺伝子発現量の比較

HER2 症例のみに着目し、平均 ERBB2 発現量による遺伝子発現量の違いを比較した。全症例の平均 ERBB2 発現量から ERBB2-high 群と ERBB2-low 群に分け、パスウェイ解析を行った。ERBB2 高発現群と ERBB2 低発現群の UMAP プロットを図 3A に示す。パスウェイ解析の結果、上流の制御因子には IGF、IGF1R、EGF などの細胞増殖因子や免疫関連因子が含まれていた（図 3B）。さらに、12 個の miRNA が ERBB2 発現の上流制御因子であると予測された。

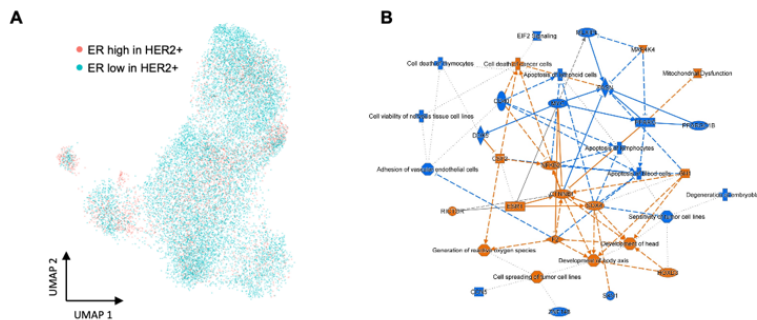
図 3



(5) luminal-HER2 サブタイプと pureHER2 サブタイプ間の遺伝子発現の比較

データセット内の HER2 サブタイプは、luminal-HER2 サブタイプ (ER 陽性/HER2 陽性) と pureHER2 サブタイプ (ER 陰性/HER2 陽性) に大別される。そこで、2 種類のサブタイプ間で遺伝子発現量を比較し、ER の状態が HER2 陽性乳癌に及ぼす影響を調べるためのパスウェイ解析を行った。図 4A に luminal-HER2 サブタイプと pureHER2 サブタイプの UMAP プロットを示す。パスウェイ解析の結果、ESR1、CTNNB1、MYC を含む複数の遺伝子が上流制御因子として予測された (図 4B)。さらに、44 の miRNA が上流制御因子として予測された。

図 4



(6) luminal-HER2 サブタイプ、pure HER2 サブタイプ、luminal サブタイプの各サブタイプにおける代表的な乳癌関連マーカーの遺伝子発現量の比較

代表的な乳癌関連マーカー (ESR1、PGR、ERBB2、MKI67) の遺伝子発現量に関して、2つのサブタイプ (luminal-HER2 サブタイプ、pureHER2 サブタイプ) で luminal サブタイプ (ER 陽性/HER2 陰性) と比較して検討した。ERBB2 の発現は、pureHER2 サブタイプの各クラスターにびまん性に分布していたが、luminal-HER2 サブタイプの 1つのクラスターで顕著に高かった。MKI67 の高発現は、すべてのサブタイプにおいて、いずれかのクラスターで明瞭に確認された。

ESR1 の発現は、luminal-HER2 サブタイプよりも luminal サブタイプで比較的高かった。pureHER2 サブタイプでは、ESR1 の発現は他のサブタイプより著しく低かった。ERBB2 の発現は、pureHER2 サブタイプでは luminal-HER2 サブタイプよりも上昇していた。Luminal サブタイプは ERBB2 の発現が低かったが、病理所見で HER2 の結果が非増幅と定義されていても、わずかに発現していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiino S, Tokura M, Nakayama J, Yoshida M, Suto A, Yamamoto Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Investigation of Tumor Heterogeneity Using Integrated Single-Cell RNA Sequence Analysis to Focus on Genes Related to Breast Cancer-, EMT-, CSC-, and Metastasis-Related Markers in Patients with HER2-Positive Breast Cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12182286	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 椎野翔, 都倉桃子, 吉田正行, 渡瀬智佳史, 村田健, 神保健二郎, 高山伸, 首藤昭彦
2. 発表標題 乳癌のシングル細胞遺伝子発現解析プラットフォーム構築による腫瘍内不均一性の解析
3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 椎野翔, 中山淳, 都倉桃子, 吉田正行, 山本雄介
2. 発表標題 Intra-tumoral differential expression analysis in HER2 positive breast cancer using single-cell RNA sequencing analysis
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、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 Sho Shiino, Momoko Tokura, Jun Nakayama, Masayuki Yoshida, Akihiko Suto, and Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Investigation of tumor heterogeneity using integrated single-cell RNA sequence data based on HER2 status in patients with breast cancer
3. 学会等名 AACR Advances in Breast Cancer Research 2023
4. 発表年 2023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
---------	---------