

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07699

研究課題名（和文）オルガノイド技術を用いた肺扁平上皮癌の発癌、進展機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of carcinogenesis and progression in lung squamous cell carcinoma with organoid technology

研究代表者

深澤 拓也（Fukazawa, Takuya）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20379845

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）：本研究において我々は、SOXおよびPIK3CAを単独または同時に抑制できるCRISPR interference (CRISPRi)：CRISPRiSOX2、CRISPRiPIK3CA、CRISPRiSOX2PIK3CAを開発した。これらのCRISPRiを発現できる recombinant adenoviral vectorは肺扁平上皮癌の増殖を阻害し、特にSOX2、PIK3CAの双方を抑制することで、強い高腫瘍効果が誘導された。このことより両遺伝子が協調して肺扁平上皮癌の進展に関与す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

肺癌の約半数を占める肺腺癌においては、その分子機構の解明から多くのドライバー変異が明らかとなり、EGFR変異、ALK融合遺伝子、ROS1融合遺伝子、RET融合遺伝子、BRAF変異、MET変異に対する分子標的薬は、現在治療に欠かせないモダリティとなっている。一方、肺扁平上皮癌では、癌化に直接関与する分子生物学的知見に乏しく、標的薬剤の開発は遅れており、発生のメカニズムや進展機序の解明が求められている。本研究において我々は、肺扁平上皮癌の進展におけるSOX2、PIK3CAの関わりを明らかにしており、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed CRISPR interference (CRISPRi) constructs that simultaneously suppresses SOX2 or / and PIK3CA: CRISPRiSOX2, CRISPRiPIK3CA, CRISPRiSOX2/PIK3CA. These CRISPRi-expressing recombinant adenoviral vectors inhibited the growth of lung squamous cell carcinoma, especially by suppressing both SOX2 and PIK3CA. These results suggested that both genes are coordinately involved in the progression of lung squamous cell carcinoma.

研究分野：肺癌、胸膜中皮腫に対する新規補助療法の開発

キーワード：肺癌 扁平上皮癌 ゲノム編集 オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌の約半数を占める肺腺癌においては、その分子機構の解明から多くのドライバー変異が明らかとなり、EGFR変異肺腺癌やEML4-ALK転座肺腺癌に対する分子標的薬は、現在治療に欠かせないモダリティとなっている。一方、肺扁平上皮癌では、癌化に直接関与する分子生物学的知見に乏しく、標的薬剤の開発は遅れており、発生のメカニズムの根幹に関わる研究が求められる。肺扁平上皮癌の発生機序は肺腺癌に比べて不明な点が多い。即ち、中枢に生じる扁平上皮癌は、気管・気管支上皮細胞の扁平上皮化を起源として、dysplasia-carcinoma sequenceモデルで説明されるものの、各段階での詳細は不明である。さらに、近年増加傾向にある末梢型肺扁平上皮癌は、II型肺胞上皮が母細胞となることが提唱されているが、発生機序については殆ど情報がない。

近年、幹細胞研究の進歩から、3次元培養系において1つの組織幹細胞から臓器様の構造をとるオルガノイドを作製することが可能となってきた。このいわゆる小型臓器は、癌組織からも作製可能であり、新規薬剤のスクリーニングや毒性評価に応用されつつある。また、Drostらは、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集により、正常ヒト結腸オルガノイドに、大腸癌で最もよく認められる4つの遺伝子変異を導入することで腺癌の形質を獲得させた癌プロゲッションモデルを報告した (Nature. 521, 43-7. 2015)。気道上皮幹細胞に由来するオルガノイドの報告は未だ数少ない中、現在我々は、中枢気道および肺胞、そして肺癌からのオルガノイド作製と長期培養に成功している。

2. 研究の目的

多くの肺扁平上皮癌において、染色体3q上のOncCassette (オンコカセット) と呼ばれる領域に増幅が見られ、ここにコードされる*SOX2*や、*PTEN*の異常が、発生と進展に関与することが分かってきた。またこれらの遺伝子は癌の幹細胞性の維持に必要であることが報告されている。本研究において、中枢気道および肺胞由来オルガノイドに対し、ゲノム編集を用いて上記遺伝子変異を導入し、オルガノイド内で発癌させることにより、扁平上皮癌の発生過程を解析する。さらに肺扁平上皮癌細胞株および扁平上皮癌オルガノイドにおける幹細胞マーカー発現、抗癌剤感受性を調べ、肺扁平上皮癌の幹細胞性の維持と抗癌剤耐性に関する分子生物学的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺扁平上皮癌における *SOX2*、*PIK3CA* の進展への関わりの検討

上記 OncCassette 内にコードされ、肺扁平上皮癌の進展に関与することが報告されている *SOX2*、*PIK3CA* のプロモーター領域破線部に対する gRNA を作製し(図 1 A, B)、両遺伝子を単独または同時に発現できる CRISPR interference (CRISPRi)をした(図 1 C)。当該システムを発現できる recombinant adenoviral vector: Ad-CRISPRi*SOX2*、Ad-CRISPRi*PIK3CA* そして Ad-CRISPRi*SOX2/PIK3CA* を作製し(図 3A) 肺扁平上皮癌細胞に投与後の標的遺伝子発現と細胞増殖能の変化を解析した。

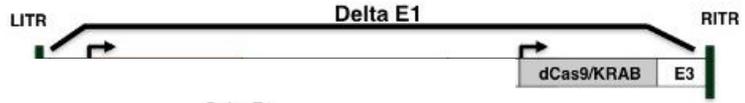
図2 A

Ad-dCas9

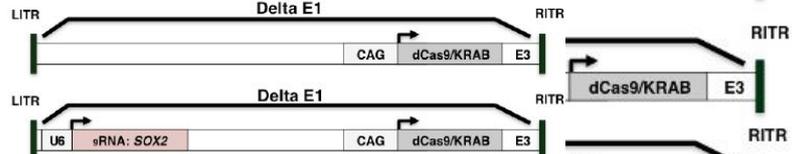


Ac 図3 A

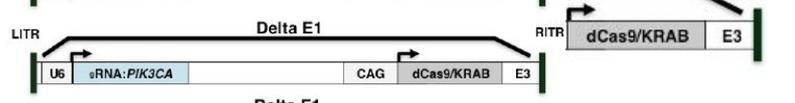
Ad-dCas9



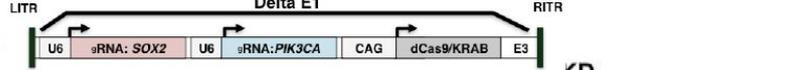
Ad-CRISPRiSOX2



Ad-CRISPRiPIK3CA

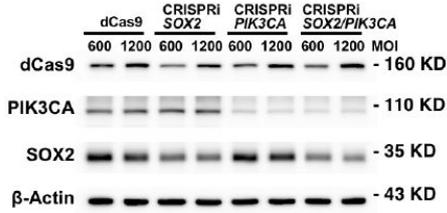


Ad-CRISPRiSOX2/PIK3CA

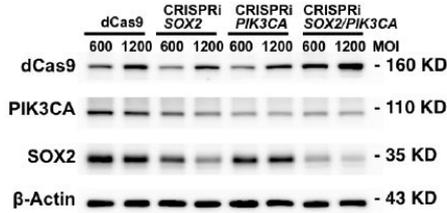


B

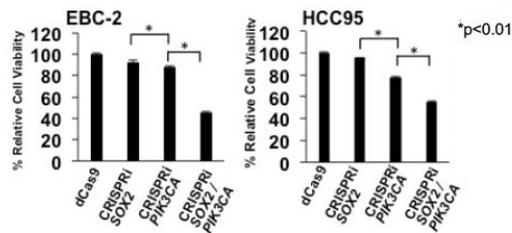
EBC-2



HCC95



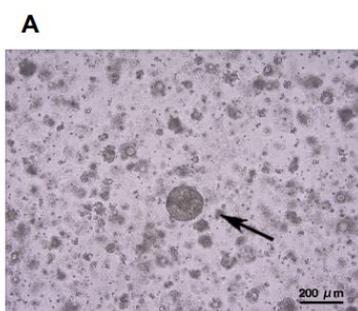
C



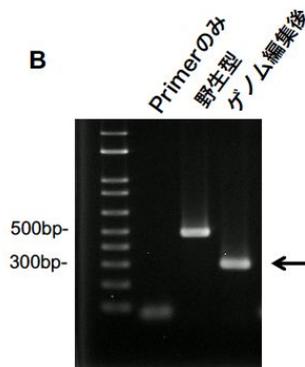
(2) 正常肺組織由来オルガノイドに対するゲノム編集を用いた変異の導入

TP53 編集が行われたオルガノイドのみが nutlin3a 添加培地内で増殖し、exon4 を検出できる特異的 primer を用いた genome PCR から両アレルにおける当該遺伝子の欠失が確認された。

図4



B



CRISPR-Cas9で左図の2箇所を二重鎖切断。両アレルに欠失が導入されている(矢印)。

正常肺オルガノイドにおけるゲノム編集条件が明確となり、また我々の研究室において編集された細胞の選定が可能となった。現在他種遺伝子の編集をこれに加え行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Yokota Etsuko, Iwai Miki, Yukawa Takuro, Yoshida Masakazu, Naomoto Yoshio, Haisa Minoru, Monobe Yasumasa, Takigawa Nagio, Guo Minzhe, Maeda Yutaka, Fukazawa Takuya, Yamatsuji Tomoki	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Precision 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) 10.1038/s41698-021-00166-3	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 深澤拓也	4. 巻 273
2. 論文標題 人工転写因子を用いた癌抑制技術開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ 第5土曜特集 ゲノム編集の未来	6. 最初と最後の頁 885-892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fukazawa T, Yokota E, Sakuma T, Naomoto Y, Yamamoto T, Yamatsuji T
2. 発表標題 Suppression of cancer growth by transcriptional regulation based on gene editing technology
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020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	猶本 良夫 (Naomoto Yoshio) (00237190)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

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	山辻 知樹 (Yamatsuji Tomoki) (40379730)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	高岡 宗徳 (Takaoka Munenori) (50548568)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

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