

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H05554・20K20464

研究課題名(和文)微生物ゲノムが癌を治療する~ヒトが無くしたシグナル経路の再獲得による癌治療~

研究課題名(英文) Development of Therapeutic Modality for Cancers by Reviving Ancient Signal Pathways That Human Has Lost During Evolution

研究代表者

加藤 洋人 (Kato, Hiroto)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：60446549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物ゲノム資源をヒト細胞で発現可能なレンチウイルス・ライブラリとして組換え、それらをヒトがん細胞の一つひとつ導入して強制発現させる系を確立した。それらの細胞集団を用いたin vivo腫瘍について、がん細胞集団中の微生物遺伝子クローン組成を次世代シーケンスによってカウントし、ヒトがん細胞に細胞死・増殖抑制を誘導する微生物遺伝子を探索する系を樹立した。この新しいスクリーニング法によって、ヒトがん細胞に細胞死・増殖抑制を引き起こす微生物遺伝子を同定することができた。本研究によって、きわめて広範な探索空間を持ったオリジナリティの高い機能ゲノミクス・スクリーニング法を開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞はその生存・増殖のために特異的な遺伝子変異やシグナル異常に依存していることが多く、そのような特異的な変異遺伝子や異常シグナルの阻害を狙った分子標的治療の開発が活発に進められている。ところが、がん細胞にみられる遺伝子異常やシグナル伝達異常についての多くの知見が得られているにもかかわらず、有効な分子標的治療薬の開発は困難なままである。がんに対する有効な分子標的治療薬の開発は社会的に求められており、新しいタイプの分子標的候補の同定は重要な研究課題といえる。本研究は、新規がん治療標的候補の探索を目的として、新しいがん分子標的探索スクリーニング法の開発を計画したものである。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I established lentivirus libraries consisting of global microbial ORFs in a format that is able to be overexpressed in mammalian cells. Then, I established an experimental protocol by which single microbial gene is integrated into one human cancer cell. The heterogenous human cancer cell populations after lentivirus infection were implanted into mice; then, resultant in vivo tumors were subjected to DNA purification and NGS analysis. By counting population sizes of the microbial gene clones in the tumors of heterogenous human cancer cells, candidate microbial genes that could inhibit cell growth or induce cell death in human cancer cells were explored. I succeeded in identifying multiple microbial genes by this screening. Taken together, I developed a highly original method of functional genomics screening which successfully covers an extremely wide screening space.

研究分野：ゲノム科学を基盤としたがん研究

キーワード：機能ゲノミクス・スクリーニング 微生物ゲノム がん治療 次世代シーケンス 合成生物学

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞はその無尽蔵な生存・増殖のために特異的な遺伝子変異やシグナル異常に依存していることが多く、そのような特異的な遺伝子変異やシグナル異常を標的とした分子標的治療の開発が精力的に進められている。ところが、近年ではがん細胞にみられる遺伝子異常やシグナル伝達異常についての膨大な知見が蓄積され、分子標的候補が多く見つかるにもかかわらず、有効な分子標的治療薬の開発には困難がともなっているのが現状である。がんに対する有効な分子標的治療薬の開発は社会的に強く求められており、新しい有効な分子標的候補の探索は重要な研究課題である。そこで本研究計画では、これまでにない新しいがん分子標的探索スクリーニング法を開発することによって、新しい視点に立った新規がん治療標的候補の探索を進めていくことを計画した。

本研究で創出するがん分子標的探索スクリーニング系では、全遺伝子スケールでさまざまな微生物 cDNA ライブラリを作成し、それらの遺伝子ライブラリをヒト細胞に導入することによって、ヒト細胞内のシグナル伝達経路に予想外の反応を起こさせることを狙った。それによって「既知のシグナル経路」という探索空間を超えたところでがん細胞の弱点を見出し、新しいがん治療標的候補を探索するという、挑戦的な実験系の開発を進めることを計画した。

## 2. 研究の目的

この研究の目的は、新しいがん分子治療標的を探索するために、従来のスクリーニング法では探索されることがなかった想定外の生命現象を含めたより広いスクリーニング空間を作り出し、「予測不可能な未知の生命科学現象」を捉えるとともに、そこから得られる知見を基盤として新規のがん治療標的を探索することである。

本研究で創出を狙った機能ゲノミクス・スクリーニング系では、さまざまな微生物の全ゲノムスケールの cDNA ライブラリを作成し、それらのライブラリをヒト細胞に導入することによって、ヒト細胞内のシグナル伝達経路などに未知の生物学的刺激を与えることを狙った。それによって「ヒト細胞における既知のシグナル経路」という枠組みの外で、新しいがん分子治療標的を探索することを立案した。

## 3. 研究の方法

本研究は次の3段階で進められた。すなわち、(1) さまざまな微生物 cDNA を網羅したレンチウイルス・ライブラリの樹立、(2) それらの微生物 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニング系の確立、(3) スクリーニングから捉えられた細胞生物学的現象の検証実験、の段階で進めた。以下に、各々の具体的な方法を記載する。

### (1) さまざまな微生物 cDNA を網羅したレンチウイルス・ライブラリの樹立

大腸菌その他のさまざまな微生物について、全遺伝子を網羅した ORF ライブラリを基盤として、それらをヒト細胞で発現可能なレンチウイルス・プラスミドライブラリとして組換えた。ライブラリにおける各遺伝子のプラスミド・コピー数ができる限り均等な組成になるよう、さまざまな工夫を加えるながら、均質なライブラリの構築を進めた。

### (2) 微生物 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニング系の確立

次の2段階で進めた。

[1] 第一に、ヒトがん細胞に対して1細胞に1つのレンチウイルスが導入されるような感染タイトレーションを決定した。がん細胞集団において、1細胞あたり1つの微生物遺伝子レンチウイルスが導入されるような感染タイトレーションを検討し、それによって、細胞1個ごとに異なる1つの微生物遺伝子が強制発現されるような環境を作った。それぞれのヒトがん細胞株に対応するさまざまな感染プロトコルを確定した。

[2] マウス *in vivo* 環境を用いた機能ゲノミクス・スクリーニング系を検討した。具体的には、レンチウイルス・ライブラリ感染後のヘテロなヒトがん細胞集団を免疫不全マウスに移植して増殖させた。*in vivo* 環境のクローン・セレクションを経て増殖したがん組織からゲノム DNA を抽出し、ゲノム中に導入された微生物遺伝子レンチウイルス・ライブラリに該当する配列のユニバーサル PCR を行った。PCR 産物に対する次世代シーケンスを行うことによって、*in vivo* 腫瘍を構成したヒトがん細胞集団における微生物遺伝子のコピー数の組成を解読した。マウス移植前のがん細胞集団における微生物遺伝子コピー数との比較で、*in vivo* 腫瘍内でポピュレーションの減少を呈した微生物遺伝子クローンは、すなわち当該微生物遺伝子の発現によってヒトがん細胞に増殖抑制や細胞死がもたらされたものと推定し、そのような微生物遺伝子のリスト化を進めた。

### (3) スクリーニングから捉えられた細胞生物学的現象の検証実験

(2)の機能ゲノミクス・スクリーニングによって得られた「ヒトがん細胞に細胞死・増殖抑制を起こす微生物遺伝子」について、それらの微生物遺伝子がヒト細胞にどのようなメカニズムで細胞死・増殖抑制を引き起こすのか、さまざまな側面から分子生物学的に探索を進

めることで、検討を進めた。なかでも、ヒトには存在しない微生物特有のシグナル経路などに特に着目し、従来のスクリーニング系ではみられなかった新しいがん分子治療標的の候補となる分子・経路の探索を進めた。

#### 4. 研究成果

本研究計画では、さまざまな微生物 ORF 資源をヒト細胞で発現可能な形式でレンチウイルス・ライブラリとして組み換え、それらのレンチウイルス・ライブラリを個別のヒトがん細胞の一つひとつ導入することで1細胞に1遺伝子を強制発現し、次世代シーケンスによって *in vivo* 腫瘍における微生物遺伝子のクローン組成をカウントすることで、ヒトがん細胞に細胞死・増殖抑制を誘導する微生物遺伝子を探索する系の樹立を狙った。

本研究によって、さまざまな微生物ゲノム資源を用いたレンチウイルス・ライブラリを構築することができた。それらのレンチウイルス・ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニング系の洗練化も進めることができ、さまざまなヒトがん細胞株における機能ゲノミクス・スクリーニングを実施することで、実際にヒトがん細胞株に細胞死や増殖抑制を引き起こす微生物遺伝子を多く同定することができた。

そのようにして同定された微生物遺伝子のなかには、ほぼすべてのヒトがん細胞に細胞死を引き起こすような、非特異的な毒性を呈すると考えられる遺伝子も多くみられた。本来ヒトが持っていないはずの微生物遺伝子を強制発現することで、ヒト細胞に強い毒性がもたらされたと考え、それらの微生物遺伝子およびそれによって引き起こされた細胞生物学的現象は、ヒトがん細胞だけでなくヒト正常細胞に対しても毒性を呈すると考えられることから、そのような微生物遺伝子はがん分子治療標的としての応用可能性は低いと考えられた。

その一方で、特定のヒトがん細胞だけに増殖抑制あるいは細胞死をもたらす微生物遺伝子も多く見つけることができた。このような微生物遺伝子は、広範な非特異的な毒性を呈しているわけではなく、ヒト細胞内において何らかの機能性を有し、特定の何らかの特性を持ったヒトがん細胞に特異的に抗腫瘍反応を引き起こしているということが考えられた。これまでに、このようなタイプの微生物遺伝子のヒト細胞における細胞生物学的な機能解析を進めることができ、多くの興味深い知見を得ることができた。ヒトが持っていない遺伝子がヒトがん細胞内で実際にどのような機能を果たしているか、具体的にどのようなシグナル経路によってヒトがん細胞に細胞死・増殖抑制が引き起こされているか、その多くはまだ推定の域を出ていない印象でもあるが、今後の研究と応用に繋がる基盤的成果が得られたといえる。

本研究によって、従来のスクリーニング法では探索されることがなかったきわめて広範な探索空間を持ったオリジナリティの高い機能ゲノミクス・スクリーニングのツールが開発された。この新しいがん分子治療的探索スクリーニング法を応用することによって、新しい有効ながん分子治療標的を発見していくことが次の目標である。また、この研究によって開発された機能ゲノミクス・スクリーニング法は、がん研究だけでなく、より広い範囲の生命科学研究にも応用可能であることが考えられ、分野横断的な実験ツールとして汎用化していくことを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤洋人, 山本麻未, 石川俊平.
2. 発表標題 大腸菌ゲノム資源を用いた機能ゲノミクススクリーニングによるがん治療標的の探索
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤洋人, 石川俊平.
2. 発表標題 微生物cDNAを用いた機能ゲノミクススクリーニングによるヒトがん治療法の探索
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------