

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06945

研究課題名(和文) CRISPR libraryを用いた網羅的細胞間相互作用解析モデルの開発

研究課題名(英文) Analysis of Cell-cell interaction models with CRISPR library

研究代表者

倉田 盛人 (Kurata, Morito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40451926

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)：幹細胞と間質支持細胞の相互作用により薬剤耐性が誘導されることが知られている。今回新たな実験系である「間接的CRISPR screening」を確立した。間質支持細胞にCRISPR libraryと紫外線照射にて緑色から赤色へ光変換するDendra2を導入し、抗癌剤下で腫瘍細胞株と共培養した。スクリーニングにより39遺伝子を同定し、候補遺伝子の中で、C9orf89, MAG12, MLPH, RHBDD2欠損支持細胞で薬剤耐性を誘導することが確認された。今回確立した間接的CRISPR screeningは細胞間相互作用機序の解明や新薬開発の新たなプラットフォームになり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は、薬剤曝露などの条件下でランダム変異を誘発するCRISPRライブラリーを用いて腫瘍細胞の選択的な生存/死滅を検出することにより、薬剤耐性候補遺伝子が同定されてきました。しかし、「がん微小環境」などの周辺環境からの細胞間相互作用による薬剤耐性の場合、細胞間相互作用による薬剤耐性の責任候補遺伝子の同定は困難でありました。これは、周囲の支持細胞にランダムな変異が誘導されても、支持細胞自身は薬剤下で選択的に生存/死滅することがないためです。そこで、我々は薬剤耐性を誘導できる支持細胞を分離するシステムを併用し、「間接的CRISPR screening」と名付けました。

研究成果の概要(英文)：Indirect CRISPR screening for drug resistance with cell-cell interactions was invented. The photoconvertible fluorescent protein Dendra2 was inducted to supporting cells and explored the drug resistance responsible factors of supporting cells with CRISPR screenings. Random mutated supporting cells co-cultured with leukemic cells induced drug resistance with cell-cell interactions. Supporting cells responsible for drug resistance were isolated with green-to-red photoconversion, and 39 candidate genes were identified. Knocking out C9orf89, MAG12, MLPH, or RHBDD2 in supporting cells reduced the ratio of apoptosis of cancer cells. Indirect CRISPR screening was established to isolate the responsible elements of cell-cell interactions. This screening method could reveal unknown mechanisms in all kinds of cell-cell interactions and it could be a platform for discovering new targets of drugs for conventional chemotherapies.

研究分野：がん生物学

キーワード：薬剤耐性 CRISPR screening 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

科学の進歩に伴い、分子標的薬が創薬され治療可能となった腫瘍は多い。しかしながら、急性骨髄性白血病など治療法が大きく変わってはいない腫瘍も数多く存在し、治療抵抗性が未だに重要は課題となっている。通常、白血病細胞は化学療法により治療され、大部分の腫瘍細胞は体内より取り除かれるが、少数の白血病幹細胞が微小環境に残存し保護されていることにより、化学療法後に再び増殖・再発が起きると考えられている。白血病の再発を防ぐ為には、微小環境において、白血病幹細胞を保護するメカニズムの全貌を解明する必要があり、網羅的な解析が有用である。また、網羅的解析により、再発を防ぐ新規分子標的薬の候補分子を見つけることが可能である。

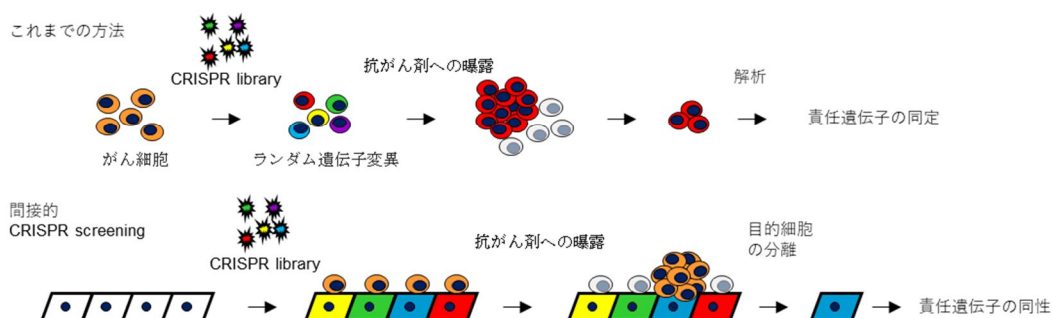
2. 研究の目的

生体内での微小環境の網羅的解析の為に、一先ず in vitro における応用モデルの解析が必要と考えられる。そこで、本研究ではランダム変異にて原因遺伝子の同定が可能な CRISPR library を用いる。in vitro において支持細胞にランダムな変異を導入し、薬剤暴露下において接する細胞に薬剤耐性を誘導する疑似微小環境を作成し、構成する支持細胞を同定・分離・解析できるシステムの構築を目的とする。

3. 研究の方法と成果

従来の CRISPR screening 法では、薬剤曝露などの条件下でランダム変異を誘発する CRISPR ライブラリーを用いて腫瘍細胞の選択的な生存/死滅を検出することにより、薬剤耐性候補遺伝子が同定されてきた。しかし、「がん微小環境」などの周辺環境からの細胞間相互作用による薬剤耐性の場合、細胞間相互作用による薬剤耐性の責任候補

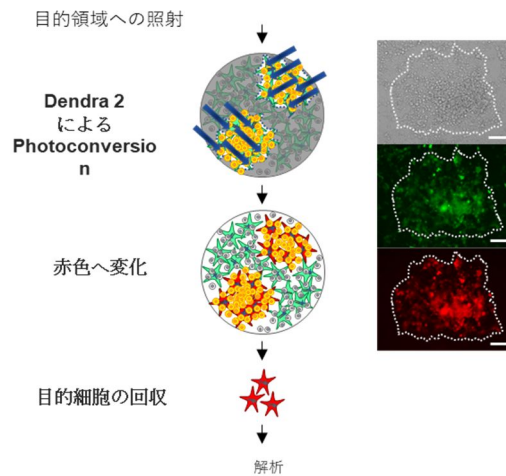
図 1：これまでの CRISPR screening 方法と新規「間接的 CRISPR screening 法」



遺伝子の同定は困難であった。これは、周囲の支持細胞にランダムな変異が誘導されても、支持細胞自身は薬剤下で選択的に生存/死滅することがないためである。そこで、我々は薬剤耐性を誘導できる支持細胞を分離するシステムを併用し、「間接的 CRISPR screening」を開発した(図 1)。

具体的には、紫外線により蛍光の波長が変わる (Photoconversion) タンパク質 Dendra2 を支持細胞に組み込んでおき、その支持細胞と接触することにより、腫瘍細胞が薬剤中で生存できる状態を誘導し、その薬剤耐性を誘導した責任支持細胞 (腫瘍細胞が増殖した細胞の支えになっている細胞) に紫外線を照射し、蛍光波長を緑色から赤色に変換させることにより、薬剤耐性を誘導できなかった細胞と区別し、責任細胞を回収・解析した (図 2)。

図 2：紫外線により蛍光の波長が変わるタンパク質Dendra2の応用



回収した細胞から責任となる候補遺伝子を同定した。得られた候補遺伝子に対して、抗癌剤により細胞死の抑制ができるか、再度支持細胞に各候補遺伝子の欠損を誘導し、腫瘍細胞と共培養する確認実験を行ったところ、候補遺伝子の中で *C9orf89*, *MAGI2*, *MLPH*, *RHBDD2* において細胞死の抑制がみられた (図 3)。

さらなる解析の為、腫瘍細胞の周囲に間質細胞が豊富で治療抵抗性をしめす膀胱癌検体を用いて解析した。実際に、候補遺伝子の中で *RHBDD2* において、癌周囲間質細胞での発現陰性群では陽性群と比較して有意に全生存期間が短縮していることが判明した (図 4)。この結果は、今回の「間接的 CRISPR screening」で同定された *RHBDD2* が、腫瘍周囲の間質で発現が欠損することにより、抗癌剤の薬剤耐性を誘導し、生存期間が短縮している可能性を示唆している。

本研究では、紫外線照射により光変換可能な蛍光タンパク質 Dendra2 を用いた新たな CRISPR screening システムである「間接的 CRISPR screening 法」を確立し、細胞間相互作用で誘導される新たな薬剤耐性責任分子を同定することに成功した。

図 3：各候補遺伝子変異による細胞死の抑制

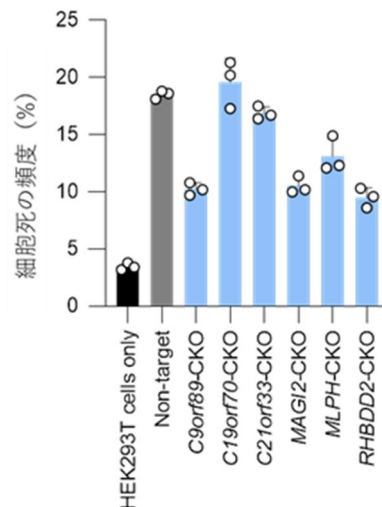
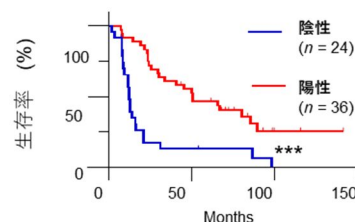
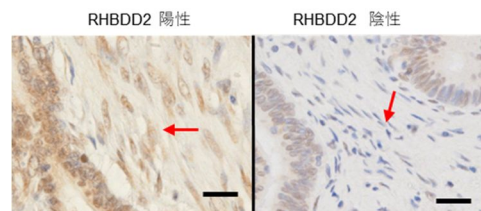


図 4：RHBDD2の発現と予後



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kurata Morito, Antony Marie Lue, Noble-Orcutt Klara E., Rathe Susan K., Lee Yoonkyu, Furuno Hidehiro, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Yamamoto Kouhei, Kitagawa Masanobu, Largaespada David A., Sachs Zohar	4. 巻 20
2. 論文標題 Proliferation and Self-Renewal Are Differentially Sensitive to NRASG12V Oncogene Levels in an Acute Myeloid Leukemia Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1646 ~ 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-22-0109	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 該当する
1. 著者名 Tatsumi Akiya, Hirakochi Haruka, Inoue Satomi, Tanaka Yosuke, Furuno Hidehiro, Ikeda Masumi, Ishibashi Sachiko, Taguchi Towako, Yamamoto Kouhei, Onishi Iichiroh, Sachs Zohar, Largaespada David A., Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of NRAS Downstream Genes with CRISPR Activation Screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1551 ~ 1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology11111551	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 該当する
1. 著者名 Sugita Keisuke, Onishi Iichiroh, Nakayama Ran, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Inoue Miori, Narita Rina, Oshima Shiori, Shimizu Kaho, Saito Shinichiro, Sato Shingo, Moriarity Branden S., Yamamoto Kouhei, Largaespada David A., Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 6
2. 論文標題 Indirect CRISPR screening with photoconversion revealed key factors of drug resistance with cell-cell interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04941-9	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉田 佳祐, 倉田 盛人, 中山 蘭, 大西 威一郎, 山本 浩平, 北川 昌伸
2. 発表標題 CRISPR screeningを用いた細胞間相互作用により誘導される薬剤耐性関連分子の同定
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 佳祐, 倉田 盛人, 中山 蘭, 大西 威一郎, 山本 浩平, 北川 昌伸
2. 発表標題 CRISPR KO libraryを用いた細胞間相互作用により誘導される薬剤耐性機序の解明
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田盛人
2. 発表標題 ランダム変異スクリーニングを利用したがん治療ターゲットの網羅的検索
3. 学会等名 第69回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

・東京医科歯科大学におけるプレスリリース 「新規CRISPR screeningを用いた薬剤耐性の解明」 https://www.tmd.ac.jp/press-release/20230601-1/
・Sicence Japanによる掲載記事 「TMDU achieves identification of molecules involved of drug resistance in cancer microenvironment by new screening method」 https://sj.jst.go.jp/news/202308/n0817-02k.html

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			
米国	David Largaespada	Minnesota University	Masonic Cancer Center	
米国	Branden Moriarity	Minnesota University	Masonic Cancer Center	
米国	Zohar Saches	Minnesota University	Masonic Cancer Center	