

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19575

研究課題名（和文）癌の個性に迫るオルガノイド遺伝子改変技術の開発

研究課題名（英文）Development of organoid gene analysis system elucidating individual differences in cancer.

研究代表者

関根 圭輔（SEKINE, KEISUKE）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：00323569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：プライマリ癌細胞に蛍光タンパク質のBFP 発現遺伝子を導入し、BFPに対して1アミノ酸置換することで蛍光がGFPに変換する遺伝子改変を実施し、GFP陽性率を解析するモデルシステムを構築する。このモデルシステムを用いて以下の検討を実施し、数%の遺伝子改変効率達成をおこなった。まず、組み替えの為の遺伝子導入が一つのハードルになっていると考えられるため、エレクトロポレーション法その他、遺伝子導入試薬の検討、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる導入の検討、PrimeEditorを用いた遺伝子改変効率の比較検討を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の個性は遺伝子変異に加え、ゲノム背景や癌細胞の細胞特性に起因すると考えられるため、患者由来のプライマリ癌細胞が利用されるようになってきている。次世代シーケンス解析の発展により、VUS (Variants of Uncertain Significance) と呼ばれる臨床的意義不明のバリエーションが多く見つかり、VUSの機能解析を実施する為にはin vitroで操作可能な癌オルガノイドを対象とした効率の良い遺伝子改変技術の開発が不可欠であり、本研究ではVUSの機能解析に向けたゲノム編集技術の効率化検討が実施され、将来的な癌治療に向けた基礎研究の基盤になると期待される。

研究成果の概要（英文）：We constructed a model system by introducing a gene expressing the fluorescent protein BFP into primary cancer cells and performing a genetic modification where a single amino acid substitution in BFP converts its fluorescence to GFP. Using this model system, we conducted studies and achieved a few percent gene modification efficiency. Firstly, we considered gene introduction for recombination to be a hurdle. Therefore, we explored gene delivery methods such as electroporation, gene delivery reagents, and introduction using Adeno-Associated Virus (AAV) vectors, and compared gene modification efficiencies using PrimeEditor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が6-10%と極めて予後が悪い難治癌である。手術適応症例に限っても5年生存率20%程度であることから、膵癌に対する新規抗がん剤の開発が望まれる。

癌の個性は遺伝子変異に加え、ゲノム背景や癌細胞の細胞特性に起因すると考えられるため、患者由来腫瘍組織移植モデル(PDX)や患者由来のプライマリ癌細胞が利用されるようになってきている。しかしながら、患者検体を比較する上では摘出時の癌の進展度や変異が異なることから、癌の特性におよぼす遺伝子変異とゲノム背景の違いを区別して評価することが困難である。特に、次世代シーケンス解析の発展により、VUS (Variants of Uncertain Significance) と呼ばれる臨床的意義不明のバリエーションが多く見つかっており、機能未知の遺伝子の変異の他、例えば癌抑制遺伝子として有名な p53 などにおいても臨床的意義不明のバリエーションが数多く存在する。従ってこれらの機能解析はがん治療へ向けた新たな標的としての可能性が期待されている。しかしながら、VUSの機能解析を実施する為には *in vitro* で操作可能な癌オルガノイドを対象とした効率の良い遺伝子改変技術の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

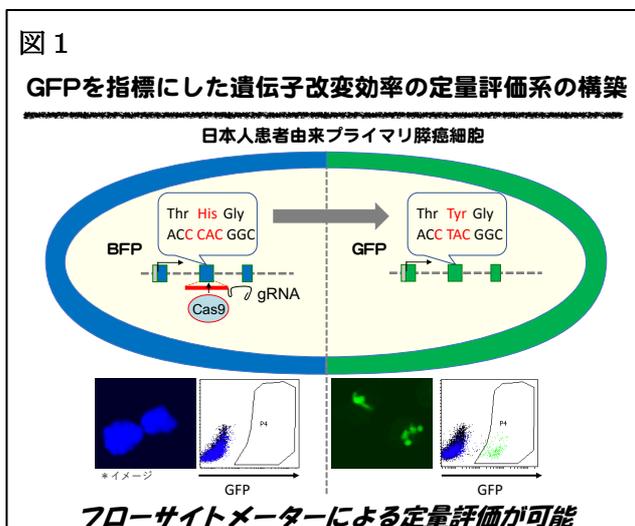
本研究課題では、癌の個性の実態解明へ向け、癌オルガノイドを対象とした効率の良い遺伝子改変技術の開発、すなわち遺伝子変異を制御することで遺伝子変異とゲノム背景を切り分けて、VUSを含む真に重要な遺伝子変異とゲノム背景を明らかにするための手法開発を目指す。さらに、開発した効率の良い遺伝子改変技術を用いて、特にVUSに注目し一つ一つ検証し、同一ゲノム背景での遺伝子変異の違い、異なるゲノム背景での同一遺伝子変異の違いによる薬剤応答の違いを明らかにすることをめざす。また、目的の遺伝子変異が導入されたクローンの選別手法の開発も実施する。

3. 研究の方法

現状でプライマリ癌細胞を対象に遺伝子改変は1%以下と極めて効率が悪い。遺伝子導入効率が悪いこと、遺伝子組み換え効率が悪いことなどが原因として挙げられる。数%の効率では数百~数千個単位で単離する必要があるが、労力、コスト両面から実験的に困難である。これらの課題を解決するため、1. 効率の良い遺伝子改変技術の開発、2. 組み換え体の検出法の開発を実施する。遺伝子改変効率を簡便かつ正確に計測するため、プライマリ癌細胞に蛍光タンパク質のBFP発現遺伝子を導入し、BFPに対して1アミノ酸置換することで蛍光がGFPに変換する遺伝子改変を実施し、GFP陽性率を解析するモデルシステムを構築する。このモデルシステムを用いて以下の検討を実施し、数%の遺伝子改変効率達成および、遺伝子改変が成功したクローンの標識を目指す。まず、組み替えの為の遺伝子導入が一つのハードルになっていると考えられるため、エレクトロポレーション法の他、遺伝子導入試薬の検討、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによる導入も検討する。更に、遺伝子導入された細胞を濃縮することで効率を高めるため、guide RNAに蛍光色素を融合させ導入細胞を選別する方法を試みる。また、PrimeEditor、BaseEditorを用いた遺伝子改変効率の比較検討を実施する。

4. 研究成果

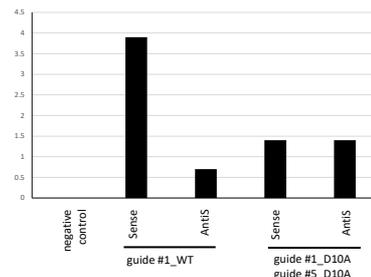
まず、1塩基置換によってGFPに変化するBFP遺伝子を作製、すなわち、CACをTACに変化させることでアミノ酸がHistidine(His)からTyrosine(Tyr)へ変化する事でBFPからGFPに変化可能になる。作製したBFPをレンチウイルスにより恒常的発現プライマリ癌オルガノイドを樹立した(図1)。これにより、1塩基置換の効率をフローサイトメトリーを用いて定量的に評価することを可能とした。この細胞を用いてsingle strandのdonor DNAの導入効率を確認し、次にdonor DNAのsense、anti-senseの違いによる効率を検討した。すると、double-strand breakを起こす野生型のCAS9を用いた場合でもstrandの違いによって導入効率が5倍以上違いが見られる場合があることが明らかとなった(図2)。double-strand breakが起きていることを考えるとこれはdonor DNAあるいは標的配列の高次構造による違いによると考えられ、標的によ



てどちらの strand を donor とするのがより効率が良いのかが異なり、また場合によっては strand による違いが見られない場合もあると考えられた。次に、野生型 CAS9 による double-strand break の導入では非相同性末端結合 (Non-homologous end joining; NHEJ) のために塩基欠損や追加が行われ、一塩基置換が阻害されることが予想されたため、single-strand break を引き起こす D10A 変異を導入した CAS9 を用いて同様の検討を行った。すると予想に反して変換効率は sense strand、anti-sense strand いずれも高くなく、野生型 CAS9 と sense strand の組み合わせが最も効率が高かった。これには野生型とミュータントの核移行や DNA へのアクセス効率などの違いが考えられたが、DNA へのアクセス効率については guideRNA を同配列付近の逆 strand を用いても効率に変化はなかった。いずれにしても置換効率に大きな改善が見られないことから、遺伝子導入法について検討を行った。Electroporation と 2 種類のトランスフェクション試薬 (A, B) について検討を行った。赤色蛍光ラベルした guideRNA を用いることでトランスフェクション効率を検討し、同時に GFP で塩基置換の効率を測定した。するといずれも導入効率は 70%-80% であり、Electroporation とトランスフェクション試薬 A が同等、トランスフェクション試薬 B が 5% 程度であるが最も導入効率が優れていた。一方で、塩基置換は Electroporation > トランスフェクション試薬 A > トランスフェクション試薬 B の順で効率が良く、一定以上の遺伝子導入効率であれば大きく影響しないと考えられ、一方で手法、試薬の違いは核への到達効率などの違いが有ると考えられた (図 3)。次に、donorDNA の導入にアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて検討を行った。まず、癌オルガノイドに適した AAV セロタイプを同定したところ、導入効率は 50% 程度であった。AAV ベクターに donorDNA を組み込み、これを用いてこれまでと同様に一塩基置換効率を検討したところ、AAV ではこれまでの手法の 1/3 程度と効率の改善は見られなかった。さらに PrimeEditor を用いた検討も実施したが、一定程度の置換は見られるものの、効率は高くなくことが明らかとなった。

図 2

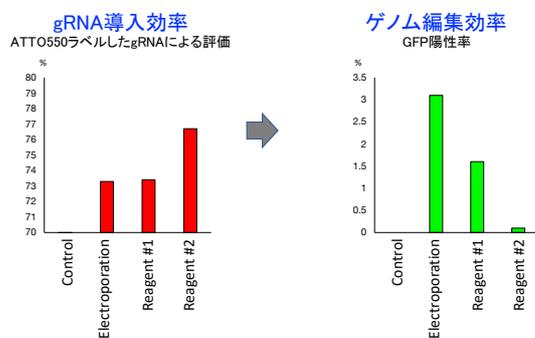
プライマリ肺癌細胞



効率の悪さは遺伝子導入効率に起因するのではないかと?

図 3

トランスフェクション方法の検討



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Krumm Johannes, Sekine Keisuke, Samaras Patroklos, Brazovskaja Agnieska, Breunig Markus, Yasui Ryota, Kleger Alexander, Taniguchi Hideki, Wilhelm Mathias, Treutlein Barbara, Camp J. Gray, Kuster Bernhard	4. 巻 38
2. 論文標題 High temporal resolution proteome and phosphoproteome profiling of stem cell-derived hepatocyte development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110604 ~ 110604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110604	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 Yasui Ryota, Matsui Atsuka, Sekine Keisuke, Okamoto Satoshi, Taniguchi Hideki	4. 巻 18
2. 論文標題 Highly Sensitive Detection of Human Pluripotent Stem Cells by Loop-Mediated Isothermal Amplification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 2995 ~ 3007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10402-3	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 Kometani Tatsuya, Kamo Koki, Kido Taketomo, Hiraoka Nobuyoshi, Chibazakura Taku, Unno Kenji, Sekine Keisuke	4. 巻 658
2. 論文標題 Development of a novel co-culture system using human pancreatic cancer cells and human iPSC-derived stellate cells to mimic the characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma in?vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.061	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 人為的がんモデルを用いたがん細胞社会の解明
3. 学会等名 第8回細胞凝集研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 患者由来癌モデルを用いたがんエコシステム解明
3. 学会等名 日本患者由来がんモデル学会2022学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 がん三次元培養モデルを用いた膵癌組織細胞間相互作用の解明
3. 学会等名 第4回がん三次元培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 がん研究入門コース(新技術)「オルガノイドを用いたがん研究」
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Elucidation and Control of Cancer Ecosystem using Artificial Cancer Tissue
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Recapitulating pancreatic cancer ecosystems by multicellular cancer organoid cultures.
3. 学会等名 AACR2022 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 がん三次元培養モデルを用いた膵癌組織細胞間相互作用の解明
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関根圭輔 (柴田龍弘 / 編)	4. 発行年 2024年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 255
3. 書名 がんゲノムペディア -77のキーワードで理解するゲノム医療とゲノム研究-	

〔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
---------	---------