

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16863

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いた卵巣癌の分子病理学的研究～ケモカインを標的として～

研究課題名(英文) Molecular pathological study of ovarian cancer using CRISPR/Cas9 system. "Targeting chemokines"

研究代表者

八幡 環 (YAHATA, TAMAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90647562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、卵巣がん進展に関与するケモカイン受容体遺伝子を欠損させ、癌微小環境下における病態生理学的役割を解明し、卵巣がんにおける新規治療戦略を開発することを目的とした。マウス卵巣癌細胞株ID8を用いて癌進展に関与するケモカイン受容体の発現量を評価した。real time RT-PCRではCCR5、CXCR4、CX3CR1、またフローサイトメトリーではCXCR4の発現を確認した。各々の遺伝子改変用ベクターを構築し、ID8にCXCR4遺伝子改変用ベクターをトランスフェクト後、目的細胞を樹立し、今後、卵巣癌進展への関与について評価を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は女性の癌死因の半数を占める。進行症例に対する治療法は腫瘍減量手術と化学療法が主となるが、長期予後は不良であり、予後改善のためには新規標的治療の確立が必要である。本研究は卵巣癌進展に関与する分子としてケモカイン・ケモカイン受容体システムに注目し、マウス卵巣癌細胞株ID8のCCR5、CXCR4、CX3CR1のケモカイン受容体発現を確認した。ゲノム編集ツールであるCRISPR/Cas9システムを用いて、これらの遺伝子の発現を欠損させた細胞株を樹立し、癌微小環境下における病態生理学的役割を解明することで、卵巣癌において、ケモカインを標的とする新規治療法確立の基盤研究となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study, we will develop a novel therapeutic strategy for ovarian cancer. We deplete the chemokine receptor gene involved in ovarian cancer progression using CRISPR/Cas9 system of genome editing technology, then, reveal its pathophysiological role in the cancer microenvironment.

First, we the evaluated the expression of chemokine receptors in mouse ovarian cancer cell lines "ID8" using real time RT-PCR and flow cytometry, the expression of CCR5, CXCR4, and CX3CR1 were confirmed by real time RT-PCR, and the expression of CXCR4 was confirmed by flow cytometry. Second, we constructed gene modification vector of CCR5, CXCR4, CX3CR1, and transfected ID8 with the CXCR4 gene modification vector, the gene knockout cells were established. In the future, we plan to evaluate the involvement in ovarian cancer progression of these chemokines.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 CRISPR/Cas9 ケモカイン PD-L1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の転移形式は非常に特異的で、腫瘍細胞は原発巣である卵巣から腹腔内に広範囲に播種・生着する。その際、サイトカインやケモカインを介して、腫瘍細胞増殖に有利な微小環境を作った上で、ケモカインとその受容体は腫瘍細胞の生存、増殖、血管新生、そして他臓器への転移などを調節している。これまで報告では、卵巣癌細胞にケモカインシステムのひとつである CXCL12 と CXCR4 が過剰発現していることが判明し、その経路活性によって腫瘍増殖および転移に関与している可能性が示された(2. *Paramita R et al. Neoplasia. 2011;13:1152-1161*)。これらを踏まえ、癌微小環境内でのケモカインを介する宿主と癌細胞の関係、各々の作用による卵巣癌の増殖・浸潤・転移のメカニズムを解明することで、新規治療戦略の開発につながると思った。これまで当科では、卵巣癌の進展・増殖におけるケモカインシステムの病態生理学的役割に着目し、CCR5 遺伝子欠損マウスにおける卵巣癌腹膜播種および皮下腫瘍モデルにおいて、野生型マウスと比較して生存率の改善及び腫瘍量の減少を認めた。また野生型担癌マウスに CCR5 阻害作用を示す vector を導入した群では control vector 群と比較し、腫瘍増殖が有意に減少したことを示した(論文投稿中)。一方、研究者らは、宿主細胞だけではなく、癌細胞由来のケモカインや癌細胞に対するケモカインシグナルの役割解明も必要であると考えた。癌細胞株の遺伝子ノックダウン方法として siRNA 法があるが、抑制が不十分となる場合もあり、CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) system を用いて、種々のケモカイン遺伝子を欠損させ、卵巣癌におけるケモカインを介した腫瘍進展のメカニズムを分子病理学的に解明するために今回の研究を企画した。

2. 研究の目的

卵巣癌におけるケモカインシステムの関連を解明し、卵巣癌に対する新たな治療戦略の基盤を構築することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

In vitro 実験

1) 卵巣癌細胞株における遺伝子発現の確認

マウス卵巣癌細胞株 ID8 におけるケモカイン・ケモカインレセプターの mRNA レベルでの発現を Real time PCR 法、蛋白レベルでの発現をフローサイトメトリーによって評価した。

2) CRISPR/Cas9 を用いた欠損細胞株の作製

組み換え DNA 実験安全委員会の承認後、CRISPR/Cas9 システムを用いて、遺伝子組み換え細胞を作製した。ケモカインレセプター遺伝子、および PD-L1 遺伝子(予備実験用)欠損細胞株を作製するため、まず同遺伝子のゲノム領域断片を pSpCas9(BB)-2A-GFP(pX458) vector に組み込み、ベクターを構築した。次に、作製したベクターを環状のままマウス卵巣癌細胞株 ID8 にリポフェクタミンを用いてトランスフェクトし、ケモカインレセプター、および PD-L1 欠損細胞株を作製した。次にフローサイトメトリー法を用いて、各種遺伝子発現が抑制されたことを確認した。

In vivo 実験

1) 遺伝子欠損卵巣癌細胞株のマウス内での腫瘍進展および予後の比較検討

プロトコールに従って野生型マウスにケモカインレセプター、および PD-L1 をノックアウトした卵巣癌細胞株を移植し、腹腔内播種重量、および腹水量をコントロール株移植マウスと比較し、さらに生存期間についても評価を行う(図1)。各実験により得られた腹膜播種組織、および腹水から ThermoFisher dice time system II を用いて mRNA を検出し、種々のサイトカイン、ケモカイン、血管内皮増殖因子等の遺伝子発現を比較検討する。

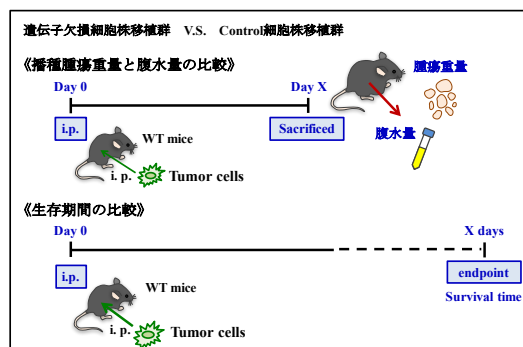


図1. 遺伝子欠損細胞株における腫瘍増殖と生存期間の比較検討

4. 研究成果

In vitro 実験

1) 卵巣癌細胞株における遺伝子発現の確認

マウス卵巣癌細胞株 ID8 のケモカイン受容体発現量を評価した。real time RT-PCR では CCR5、CXCR4、CX3CR1 の発現を確認した (図2)。またフローサイトメトリーでは CXCR4 の発現を確認した(図3)。

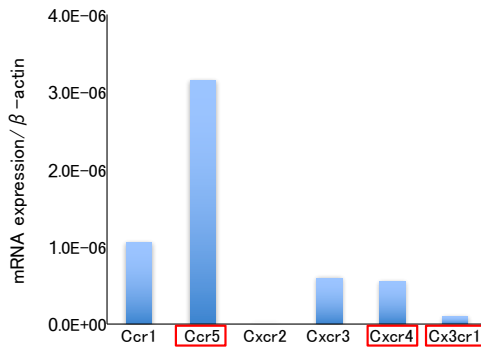


図2. ID8細胞株におけるケモカインレセプターの発現 (real time RT-PCR)

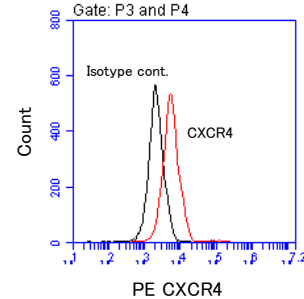


図3. ID8細胞株におけるCXCR4の発現 (FACS)

2) CRISPR/Cas9 を用いた欠損細胞株の作製

卵巣癌進展に関与していると考えられている CCR5、CXCR4、CX3CR1 の遺伝子改変用ベクターを構築した。フローサイトメトリーで発現の見られた CXCR4 の欠損細胞株を作製するため、ID8 に CXCR4 遺伝子改変用ベクターをトランスフェクト後、FACS で目的細胞をソーティングしたが、single colony としての CXCR4 遺伝子欠損細胞株の樹立が困難であった。そこで、CRISPR/Cas9 system を構築するために予備実験を行った。マウス卵巣癌細胞株 ID8 に免疫チェックポイント機構の Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) の発現が確認されており、CRISPR/Cas9 system 欠損マウス卵巣癌細胞株である PD-L1 KO ID8 を樹立した。

In vivo 実験

1) 遺伝子欠損卵巣癌細胞株のマウス内での腫瘍進展および予後の比較検討

卵巣癌進展における卵巣癌細胞上の PD-L1 の機能を評価した。その中で、マウス卵巣癌の腹膜播種モデルでは Contral ID8 株を移植したマウスと比べて、PD-L1 KO ID8 株を移植したマウスでは有意に生存期間が延長すること、また、腹膜播種モデルに抗 PD-L1 抗体を投与したマウスと比べて、PD-L1 KO ID8 株を移植したマウスでは有意に腫瘍増殖が抑制されることを実証し、CRISPR/Cas9 system を用いた遺伝子欠損細胞株作製に成功した(1. Yahata et al. Cancer Sci. 2019. 110(4):1279-1292.)。

引き続き、卵巣癌細胞株に発現しているケモカイン受容体遺伝子の検出方法を再構築し、腫瘍進展に関与するとされているケモカイン遺伝子欠損細胞株を樹立後、in vitro、in vivo での検討を行う予定である。

<引用文献>

1. Yahata et al. Cancer Sci. 2019; 110(4):1279-1292.
2. Paramita R et al. Neoplasia. 2011;13:1152-1161.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iwahashi N, Sakai K, Noguchi T, Yahata T, Matsukawa H, Toujima S, Nishio K, Ino K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Liquid biopsy-based comprehensive gene mutation profiling for gynecological cancer using CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47030-w.	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 Mabuchi Y, Takiguchi Y, Yahata T, Mizoguchi M, Sasaki N, Ota N, Minami S, Ino K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Short term outcomes of helical tomotherapy during concurrent chemoradiotherapy for advanced cervical cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 382-386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2019.1806.	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 Yahata T, Mizoguchi M, Kimura A, Orimo T, Toujima S, Kuninaka Y, Nosaka M, Ishida Y, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Hemmi H, Iwahashi N, Noguchi T, Kaisho T, Kondo T, Ino K.	4. 巻 110
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1279-1292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13958.	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 Mizoguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yahata T, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K, Mukaida N, Kondo T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0207085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0207085.	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 Ino K, Yahata T, Horiuchi Y, Yagi S, Mabuchi Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Usefulness of the Primary Tumor SUVmax on Preoperative FDG-PET/CT as a Prognostic Indicator for Patients with Gynecologic Cancers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Obstetrics, Gynecology & Infertility.	6. 最初と最後の頁 1-4
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 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 Nanjo S, Minami S, Mizoguchi M, Yamamoto M, Yahata T, Toujima S, Shiro M, Kobayashi A, Muragaki Y, Ino K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1805-1814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13452.	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 2件)

1. 発表者名 Tamaki Yahata, Naoyuki Iwahashi, Mika Mizoguchi, Saori Toujima, Tsuneyasu Kaisho, Toshikazu Kondo, Kazuhiko Ino.
2. 発表標題 PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tumor cells promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression in mouse model.
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS). (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡環、岩橋尚幸、溝口美佳、東嶋左緒里、改正恒康、近藤稔和、井篁一彦.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノム編集による腫瘍細胞上のPD-L1遺伝子欠損はマウス卵巣癌モデルにおいて抗腫瘍免疫を促進し、腫瘍進展を抑制する.
3. 学会等名 第17回婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamaki Yahata, Naoyuki Iwahashi, Mika Mizoguchi, Madoka Yamamoto, Noriyuki Sasaki, Michihisa Shiro, Yasushi Mabuchi, Shigetaka Yagi, Sawako Minami, Kazuhiko Ino.
2. 発表標題 CRISPR/Cas9-mediated genome editing and efficient PD-L1 disruption on tumor cells promote antitumor immunity and suppress ovarian cancer progression in a mouse model.
3. 学会等名 第70回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamaki Yahata, Mika Mizoguchi, Saori Toujima, Mizuho Nosaka, Yuko Ishida, Yumi Kuninaka, Akihiko Kimura, Tsuneyasu Kaisho, Toshikazu Kondo, Kazuhiko Ino.
2. 発表標題 PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-mediated genome editing in tumor cells promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression in a mouse model.
3. 学会等名 The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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