

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20600

研究課題名(和文) ヒトとゼブラフィッシュの類似点・相違点を利用した、遺伝子と化合物スクリーニング

研究課題名(英文) Zebrafish Patient Derived Xenograft (PDX) models for efficient in vivo gene and drug screening

研究代表者

細野 祥之 (Hosono, Yasuyuki)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：60820363

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)：まず我々は、Cas9を恒常発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュtg(ubiquitin:Cas9)も作成した。次いで、様々ながん種の細胞株を用いたXenograft作成手技の検討を行った。悪性リンパ腫細胞株はDOC(duct of cuvier)注入後に著明なspreadingを示すことが明らかとなり、表現型の観察に適していることが判明した。またin vivoでの評価が難しい膠芽腫PDX株の腫瘍増殖を、ゼブラフィッシュ頭蓋内注入により簡便に判定する手法を開発した。これらと並行して、ヒトゲノムに特化したCRISPRライブラリー作成のためのsgRNAのデザインも行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は極めて難治性で、明確な標的分子の存在が判明しておらず有効な分子標的薬もほぼ存在しない。また、マウスへの移植の難しさや脳血管関門(BBB)の存在により、新規治療薬の開発も非常に遅れている。本研究開発で確立した膠芽腫PDX株の頭蓋内注入による評価法を用いることで、きわめて簡便かつ5日間という超短時間でのin vivo標的分子の探索と薬剤評価が可能となる基盤が整ったと考えている。それにより膠芽腫に対する新規治療薬の開発が促進されるだけでなく、より倫理的な問題点の少ない、ゼブラフィッシュという動物モデルを用いたスクリーニングプラットフォームの実用が促進されると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to perform in vivo gene and drug screening using patient-derived xenograft (PDX) models based on zebrafish embryos. First, we re-designed sgRNAs for CRISPR library construction specialized for the human genome. Next, we investigated the techniques for creating zebrafish xenografts using various cancer cell lines. We discovered that malignant lymphoma cell lines showed significant spreading after injection into the duct of cuvier (DOC), proving suitable for cancer phenotype observation. Additionally, we generated a platform for analysis of in vivo tumor growth through intracranial injection of glioblastoma PDX lines.

研究分野：ゲノム腫瘍学

キーワード：ゼブラフィッシュ PDX シングルセルRNAシーケンス CRISPRスクリーニング 化合物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

個々のがんの多様性とがん組織内の不均一性に対応した個別化医療開始が待たれるが、道のりは平坦ではない。不均一性に対する治療法の一例として、ヒト免疫不全症候群などで用いられる多剤併用療法 of 初回投与が考えられるが、個々のがんで不均一性を決定しているゲノム情報に基づく多剤選択法の決定という難問以外にも、タイムラグ克服などの問題点も存在する。多様性の問題に対しマウス PDX (Patient Derived Xenograft) を用いた試みも開始されているが、標的遺伝子スクリーニングでは、サンプルサイズや腫瘍形成の時期的な問題があり、また化合物のスクリーニングでは、費用と労力の問題点だけでなく、タイムラグによりスクリーニングで得られた化合物がその元となった患者に使用される可能性は低い。化合物の同定と選択に目を向ければ、これまでに細胞株で行われてきたメガスクリーニングで得られた化合物が現実の医療現場に到達した事例は少なく、従来のスクリーニング法が限界を示しているのは自明の理である。しかしその中でも、フェノタイプスクリーニングで得られた化合物が過半数を占めていたとの報告もあり、近年出現したゼブラフィッシュ PDX モデルを用いたハイスループット、かつ短時間でのフェノタイプスクリーニングに対する社会の期待は大きく、多様性と不均一性の原因となるゲノム・トランスクリプト情報と、それらを元に導き出された化合物候補による多剤併用を含むフェノタイプスクリーニングを融合させた治療薬選定法の出現が待たれる。

2. 研究の目的

今回の研究開発では、ゼブラフィッシュのエンブリオを母体として作成した臨床検体由来の PDX を用いた *in vivo* スクリーニングを行う。ゼブラフィッシュとヒトではゲノム情報が異なるため、ヒトゲノム情報に対応した sgRNA ライブラリーを用いることにより、ゼブラフィッシュの体内で発育したヒト腫瘍に対する *in vivo* 遺伝子スクリーニングが可能になる。がん標的遺伝子のスクリーニングにおいては、個々の大腸がん臨床検体を用いて PDX を作成す個々のがん患者における個別化医療の標的となりうる遺伝子群の探索を行い、それらの情報を元にした化合物の単剤あるいは多剤スクリーニングを施行することで、背景で述べた問題点を解決することを目的とする。

マウス PDX を用いた効果判定と、ゼブラフィッシュ PDX で得られた結果に大差がなかった場合、実際の患者への適応はゼブラフィッシュ PDX からの直接的な導入が可能になると考えている。それにより手術や生検からのタイムラグを置かない治療方法の確立が可能になり、タイムスパンも考慮された個別化医療導入への道が開ける可能性が考えられるだけでなく、化合物同定方法を基盤とした新産業の創出にまで至る可能性も秘めており社会貢献の可能性も非常に高い。また、ゼブラフィッシュのエンブリオを用いた *in vivo* スクリーニングは、標的遺伝子、化合物スクリーニングともに生後 7-14 日目までに完了するため、諸外国における動物モデルを用いた研究における倫理的側面からの利便性も大きく、全世界で普遍的な科学技術イノベーションになる可能性をも秘めた研究開発と考えている。

3. 研究の方法

まず、実際のスクリーニングに用いる Cas9 を恒常発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ *tg(ubiquitin:Cas9)* を作成する。さらにヒトのゲノムにのみマッチし、ゼブラフィッシュのゲノムにはマッチしないカスタム sgRNA ライブラリーを構築する。構築したライブラリーから作成したウイルスを臨床検体に感染させ、第一細胞期のゼブラフィッシュエンブリオに分割頭微注入する。その後、*in vivo* セレクションを行い、さらに生育した腫瘍を複数回移植し直したのち、腫瘍細胞を回収する。腫瘍のほぼすべてを単一箇所に移植するマウス PDX モデルと異なり、一定の細胞数を何百回に分けて別々の個体に注入するゼブラフィッシュ PDX モデルでは、その時点で不均一性の問題が若干解消されるだけでなく、PDX 形成の過程でも不均一性はさらに解消されると考えている。回収した腫瘍細胞に含まれる sgRNA は、CRSIPR スクリーニング法とシングルセル RNA シークエンス法を組み合わせる方法を用いて個々の細胞の持つ遺伝子発現プロファイルと共に読み取る。CRSIPR スクリーニング法は、がんの不均一性解消に対しては相性が悪いテクノロジーであると考えられるが、シングルセル RNA シークエンス法を組み合わせることで、この問題点は解決可能であると思われる。この 2 者を組み合わせる方法は最近何通りかの方法が報告されているが、今回は CROP-seq (CRISPR droplet sequencing) 法を用いることで、「個々の細胞において細胞増殖に影響を与える遺伝子」と「不均一性を決定するトランスクリプト情報」という 2 つの軸をアウトプットとする。この際に、ゼブラフィッシュ PDX はサンプルサイズ的にもシングルセル RNA シークエンス法に適した細胞数であることも特記すべき点に挙げられる。その後、同定された遺伝子群の情報を元に化合物の *in silico* スクリーニングを行い、絞られた化合物に対してゼブラフィッシュ PDX を用いたフェノタイプスクリーニングを行う。スクリーニングは 96 well plate を用いて生後 14 日以内に完了させることでタイムラグをなくし、個別化医療実現に向けた大きな足掛かりになると考えている。

4. 研究成果

本研究開発では、がんの多様性に対応するために、ゼブラフィッシュエンブリオを母体とした患者検体由来のPDXモデルを用いて *in vivo* スクリーニングを行う。がんの不均一性を解消するため一定の細胞数を何百回に分けて別の個体に注入し、CROP-seq法を用いてsgRNAを読み取る。さらに同定された遺伝子群の情報を元に化合物の *in silico* スクリーニングを行い、その後ゼブラフィッシュPDXを用いたフェノタイプスクリーニングを行う。

まず我々は、様々ながん種の細胞株を用いて、大腸がん以外の細胞株を用いても Xenograft の作成が可能であることを確認した。非小細胞肺癌細胞株 H1299 を使用した Xenograft の作成例の HE 染色像を Fig. 1 に示す。



Fig1.

次に我々は、Cas9 を恒常発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュ *tg(ubiquitin:Cas9)* を作成した。この遺伝子改変ゼブラフィッシュにおける Cas9 の発現をウエスタンブロット法により確認し、また色素斑の形成を司る遺伝子 (Tyr) を標的とした sgRNA を顕微注入すると色素斑の形成が抑制されることにより、Cas9 が生体内で機能していることも確認した (Fig. 2)。この遺伝子改変ゼブラフィッシュを使用することにより、Cas9 を顕微注入することなく遺伝子スクリーニングを行う事が可能となった。

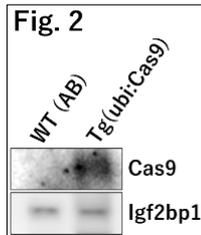
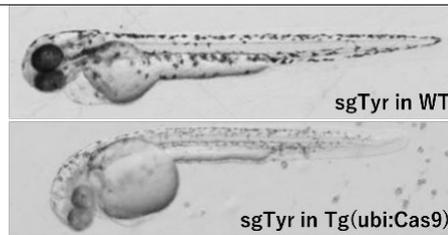


Fig. 2



一方で、臨床検体を用いた PDX 作成手技の検討としては、PDX 生着効率を向上させるために様々な細胞調整方法と飼育方法、さらには画像撮影方法を試みたが、臨床検体生着率は極めて低いことが判明したため、再び細胞株に立ち返って Xenograft 生着率向上の検討を行った。結果として、一般的な細胞株に対する細胞注入部位は、これまで用いられてきた PVS (perivitelline space) と比較して DOC (duct of cuvier) の方が細胞注入部位として優れていることが判明した。特に、悪性リンパ腫細胞株は DOC 注入後に著明な spreading を示すことが明らかになり、表現型の観察に適していることが判明した (Fig. 3)。



Fig. 3

また、極めて難治性で分子標的薬の開発が遅れている膠芽腫に対しても、今回の CRISPR *in vivo* スクリーニングを適応し新たな標的遺伝子を同定すべく、患者検体から樹立された PDX をゼブラフィッシュ頭蓋内に注入することにより、超短期間で腫瘍の発育を評価する手法を確立した (Fig. 4)。さらにエンブリオをマクロファージインヒビターであるクロドロン酸内包リポソームで処理することにより、腫瘍の生着率を上げることが可能であることも確認にした。

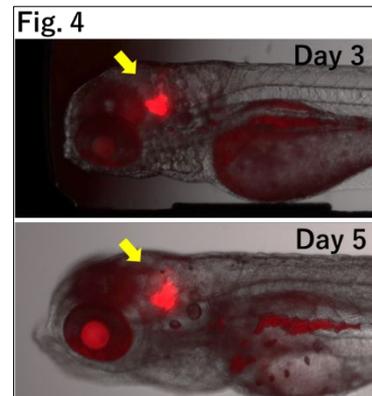


Fig. 4

これらと並行して、ヒトゲノム特異的な sgRNA ライブラリー作成として、既存ヒト CRISPR スクリーニングライブラリーに存在する sgRNA の組み合わせからゼブラフィッシュのゲノムに完全マッチする sgRNA を除外する方法を用いることで、ヒトゲノムには一致するが、ゼブラフィッシュゲノムには一致しない sgRNA 群を選定することに成功した (Fig. 5)。

今後はカスタムスクリーニングライブラリーを作成し、樹立した膠芽腫 PDX モデルを用いて、遺伝子の *in vivo* スクリーニングを行っていく予定である。

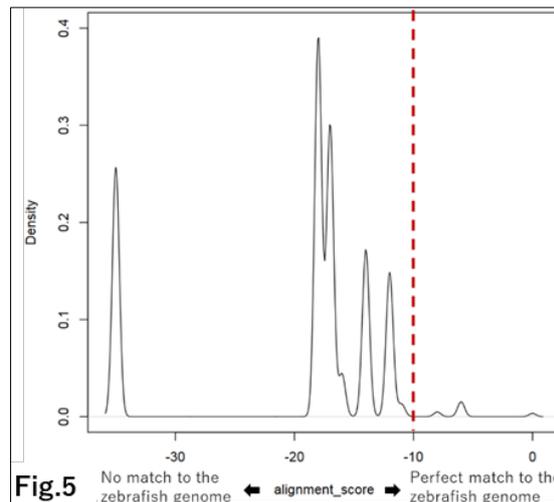


Fig.5

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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細野祥之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたがん研究
3. 学会等名 先端モデル動物支援プログラム 若手支援技術講習会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細野祥之
2. 発表標題 Zebrafish Models for Cancer Research
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

〔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	山口 類 (Yamaguchi Rui) (90380675)	愛知県がんセンター（研究所）・システム解析学分野・分野長 (83901)	

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