

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16800

研究課題名（和文）CRISPR libraryを用いた卵巣癌プロモーター制御による新規治療法の検討

研究課題名（英文）Exploration of new therapeutic target for ovarian cancer applying CRISPR library screening system

研究代表者

山本 阿紀子（Yamamoto, Akiko）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50531224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究で独自に開発したMYCの転写活性を評価するレポーターシステムを卵巣がん細胞OVSAGOに応用し、MYCの転写活性を上げる分子についてCRISPR activation libraryを用い網羅的に解析した。細胞の回収や解析方法に改変を加え、精度を改善した。次世代シーケンスの結果から、既存のデータベースを使用してMYC転写活性の制御に寄与すると思われる14個の候補分子を同定し、CRISPR systemを使用して候補分子のgRNAを細胞に導入した。デュアルルシフェラーゼアッセイを行うと、7つの分子が統計的に有意にMYCの転写活性を上げることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は予後不良であり新たな治療法の確立が急務である。近年、癌の遺伝子解析とその結果に基づき治療方針を決定するがんゲノム医療の必要性が高まっている。癌遺伝子の一つであるMYCは、卵巣癌では他の癌腫に比し高頻度で増幅していることを鑑みると、卵巣癌の発生や進展、再発に重要な役割を担っていると予測され、新たな治療ターゲットとなり得るだろうと想定される。今回の研究によりMYCの転写活性を調節する分子が同定できたことは、卵巣癌におけるMYC発現制御システムの解明の一助となると予想され、さらにこの結果を応用しMYCをターゲットとした阻害薬の開発が進めば卵巣癌の新たな治療戦略として位置づけられると期待する。

研究成果の概要（英文）：We applied a reporter system to evaluate the transcriptional activity of MYC in ovarian cancer cell OVSAGO, which we had independently developed in our previous research and conducted a comprehensive analysis using the CRISPR activation library (SAM) for unveiling molecules that increase the transcriptional activity of MYC. The system was modified to avoid the binding of MYC itself gRNAs. Based on the next-generation sequencing results, we used existing databases to select 14 candidate molecules that would contribute to the regulation of MYC transcriptional activity. When candidate gRNA molecules were introduced into cells using the CRISPR system and the Dual-Luciferase assay was performed, seven molecules were shown to statistically significantly increase MYC transcriptional activity.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 CRISPR MYC 癌遺伝子

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の罹患数、死亡数はともに増加傾向にあり、40-50%は進行癌として診断されることから婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良な疾患である。卵巣癌は初回治療としての化学療法には比較的良好に奏功するが、進行症例の半数以上が再発し、再発癌の治療としていくつかのレジメンが保険適応となつてはいるもののいずれの奏効率も 30%未満と低く、新たな治療戦略の確立が急務である。近年、本邦においても「がんゲノム医療」が始動した。癌の発生や進展、治療効果に関与する遺伝子変異の解析が進み、同じ臓器の癌であっても各々の遺伝子変異は多様であることから、癌のゲノム解析とその結果に基づいて治療方針を決定する必要性が高まっている。MYC は、最も多くの癌腫において発現が確認されている癌遺伝子の一つであるが、癌細胞における MYC の作用メカニズムは、いまだ完全には解明されていない。卵巣癌では約 40%と、他の癌腫と比較しても高頻度で MYC が増幅していることを鑑みると、卵巣癌の発生や進展、再発に重要な役割を担っていると予測され、既存の化学療法や分子標的薬とは異なる新たな治療ターゲットとなり得るのではないかと想定されるが、MYC を標的とした分子阻害薬は現在までに開発されていない。

2. 研究の目的

申請者らが行った先行研究では、MYC の発現を制御する分子の CRISPR システムを用いた新規スクリーニング方法を確立したが、同定された分子が癌細胞株に対してどのような機能を果たすかについての検討までには至らなかった。そこで、卵巣癌の細胞株に対して CRISPR スクリーニング方法を適応し、卵巣癌における MYC の発現制御に関与する分子を網羅的に同定することができれば、MYC 阻害薬の開発に寄与するのではないかと想到した。本研究の目的は、癌遺伝子 MYC の発現が卵巣癌においてどのように制御されているかを分子生物学的に解析することと、その結果を応用することにより MYC をターゲットとした新たな阻害薬の研究を行うことである。

3. 研究の方法

CRISPR library は、7 万種以上の gRNA を用いて内因性遺伝子の活性化や抑制に寄与する分子の特定を可能にする。これまでに、CRISPR library は薬物の感受性や耐性、毒素耐性等に関与する遺伝子の特定に用いられてきた。申請者らは先行研究として、八放サンゴ *Dendronephthya* sp. T. に由来する蛍光タンパク (Dendra2) の、光照射により蛍光波長を変換する特性を自家蛍光との鑑別に用い、MYC の転写活性を評価する独自のレポーターシステム (pMYC-promotor-Dendra2) を開発した。さらにはこの新たなツールを CRISPR activation library に導入することで MYC の転写活性を上げる因子のスクリーニングを行い、同定された分子を過剰発現させることで MYC の mRNA およびタンパクレベルでの発現が増強することを確認した (Yamamoto A, Kurata M, et al. Peer J, 2020)。そこで、MYC の発現率が高く、臨床的には現在もしばしば治療に難渋する卵巣癌に着目し、本研究では卵巣癌の細胞株にこのスクリーニング方法を適応することとした。また、転写・翻訳後の MYC タンパクの制御を解析する為に、MYC の Dendra2 との融合タンパクを作成し MYC の安定化・分解などに関与する分子を網羅的に解析し、阻害剤などで MYC の安定化を阻止できるシステムの構築も考察する。

(1) 卵巣癌細胞株による CRISPR screening

漿液性卵巣癌の細胞株である OVSAHO に pMYC-promotor-Dendra2 ベクターを導入したのち、CRISPR activation library (SAM)を感染させ約 7 万種の分子をランダムに活性化させる。MYC の転写が活性化され Dendra2 が陽転化した細胞を Flow cytometry を用いて回収する。回収した細胞から抽出した DNA に対して SAM で導入された gRNA の領域を PCR によって増幅し、次世代シーケンシング解析を行う。

(2) MYC 制御の検証実験

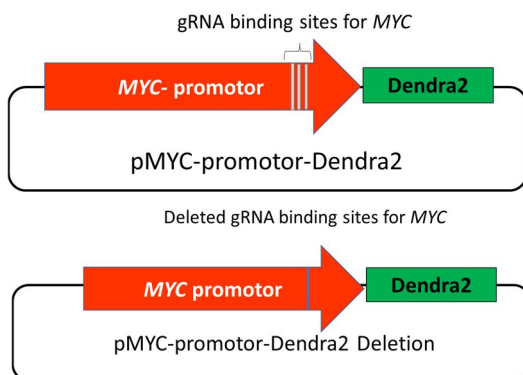
次世代シーケンス解析より得られた結果をもとに、MYC の転写活性を上昇させる分子を同定し、この同定された分子を過剰発現させることによる MYC の発現を検証する。具体的な候補遺伝子数として 100 個程度を想定している。さらに転写後のプロセッシング～タンパク質分解に関わる分子の解析も行う。

(3) 阻害化合物を用いた検証

これまでに得られた候補遺伝子に対して、阻害剤を検索し、それらを卵巣癌細胞株に対して阻害剤実験を行う。同時に同定された分子を阻害することによる MYC の発現を、quantitative PCR と western blotting 法を用いて mRNA およびタンパクレベルで評価も行う。

4. 研究成果

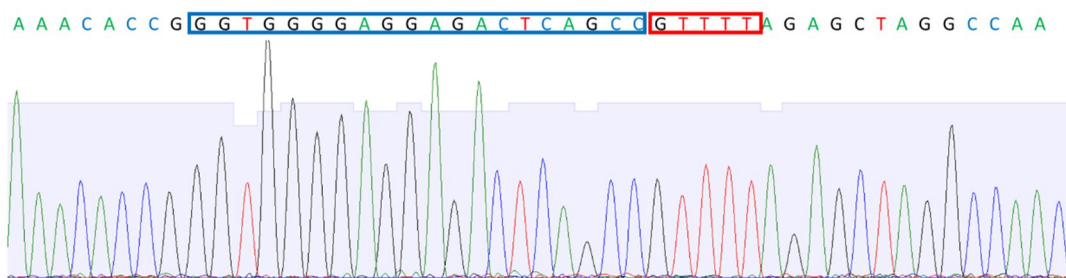
MYC promoter-reporter system の改変と細胞回収の検討



申請者らは先行研究として、八放サンゴ *Dendronephthya* sp. T. に由来する蛍光タンパク (Dendra2) の、光照射により蛍光波長を変換しうる特性を自家蛍光との鑑別に用い、MYC の転写活性を評価する独自のレポーターシステム (pMYC-promotor-Dendra2) を開発した。まず、この pMYC-promotor-Dendra2 を漿液性卵巣癌の細胞株である

OVSAHO に導入し、先行研究と同じプロトコルを用いて CRISPR activation library (SAM)を感染させ約 7 万種の分子をランダムに活性化した。セルソーターを用いて Dendra 陽性細胞を 96well プレートに回収したが、おそらく先行研究で使用した HEK 細胞と比較し、細胞の倍加時間が長いため、いずれもコロニーを形成せず解析に進めなかった。そのため、次いで 24 well プレートに一括で収集し、約 3 週間細胞培養したのち、3 つのコロニーが形成されたことを確認した。このコロニーからゲノム DNA を抽出し gRNA 領域を挟むように PCR を施行し sanger sequencing で組み込まれた gRNA 配列を解析すると、コロニーに組み込まれた分子が MYC であることが判明した。次いで培養期間に、回収した細胞が死ぬことを避けるため、再度 Dendra2 陽性細胞を一括に回収したのち、直ちにゲノム DNA を抽出した。組み込まれた gRNA 領域に対して PCR を実行し、得られたフラグメントに対して TOPO クローニングを行った。合計 15 個のコロニーについて gRNA 配列を解析すると、すべて MYC であった。そこで、MYC そのものの gRNA が結合し、Dendra が発行することを避けるために「pMYC-

promoter-Dendra2」を改変することを計画した。SAM library スクリーニング システムでは、MYC の転写開始部位から 200 bp の領域に 3 つの gRNA 結合部位が存在する。そのためこれらの 3 つの gRNA 結合部位すべてを除去しこの領域に対応する二本鎖 DNA を購入し、元のベクターに組み込みなおした。これを「pMYC-promoter-Dendra2-Deletion」と名付けた。この「pMYC-promoter-Dendra2-Deletion」を導入した OVSAHO に対して、SAM を感染させ、合計約 3,000 個の Dendra 陽性細胞を回収し、一部に対して sanger sequencing を行うと MYC 以外の gRNA が挿入されていることを確認できたため、このサンプルを次世代シーケンスに進めることにした。



データベースを用いた候補遺伝子の選択

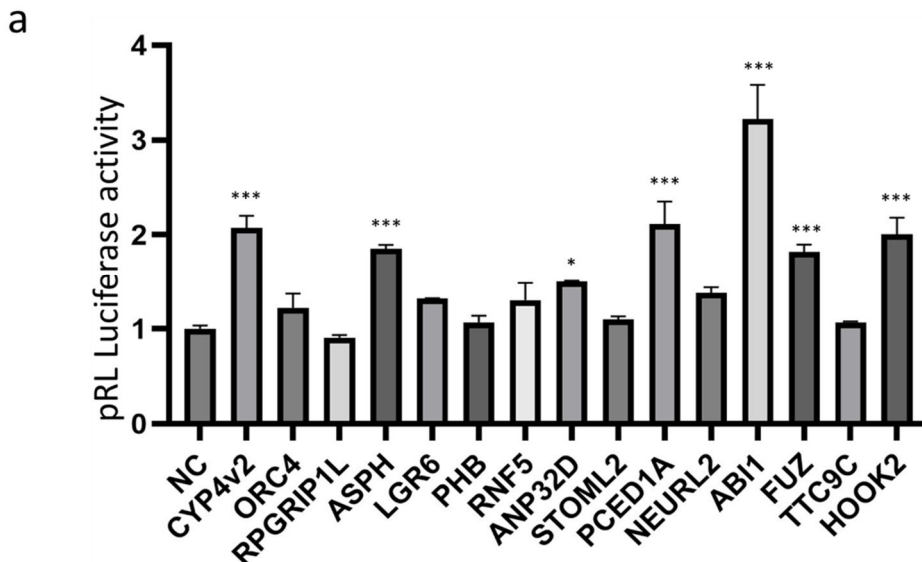
次世代シーケンスの結果、合計 4,065,162 リードが読まれ、13,595 種類の gRNA が検出された。これらの検出された gRNA の中には 1000 リードカウント以上の遺伝子が 86 個あった。この 86 遺伝子に対し、cBioPortal for Cancer Genomics データベース中の卵巣漿液性癌 (TCGA、Pan Cancer Atlas Studies) データセットで Pearson 相関係数を求め、最終的に MYC 発現と統計学的に有意に正の相関がある 14 個の遺伝子を MYC 調節因子の候補として選択した (CYP4V2、ORC4、RPGRIP1L、ADPRH、LGR6、PHB、ANP32D、STOML2、PCED1A、NEURL2、ABI1、TTC9C、FUZ、PWP2、HOOK2)。

gRNA	Gene Name	Sequence	Count	Pearson	p value
sg015083	CYP4V2	CTGCAGGTTGCTCTACGTG	1492	0.14	0.0126
sg042467	ORC4	GACATTGTAGCGGAGGTAC	1370	0.16	4.63E-03
sg051675	RPGRIP1L	TTAGCACAGGAGAATTTCCC	1353	0.16	4.47E-03
sg004415	ASPH	TCCAGTTTGCTCGGTCTT	1290	0.12	0.0341
sg032538	LGR6	TATTCTCACTTCTACAAC	1282	0.16	5.31E-03
sg044709	PHB	ACTCCAAAAGGCTATGCAG	1242	0.21	1.36E-04
sg002934	ANP32D	TAATAGATTTGGGTGTGTT	1128	0.17	2.03E-03
sg058828	STOML2	CTGTTACGCGGAAGATCCC	1106	0.18	1.38E-03
sg043681	PCED1A	TTTAGAAAAATCCGTGGTTT	1093	0.14	1.03E-02
sg039172	NEURL2	CAGAGGTGAGCTGGCACCGG	1085	0.17	2.32E-03
sg000482	ABI1	TGGGGCGATCGCTTTGGAC	1049	0.12	3.66E-02
sg022687	FUZ	CGCAGTCATCATCTCAATC	1037	0.17	2.01E-03
sg064502	TTC9C	GTGTCGCTGGTTCACCT	1014	0.12	0.0333
sg027117	HOOK2	TCCTCAAGATCCTTTTGAGA	1009	0.12	3.64E-02

候補遺伝子を用いた Dual-Luciferase レポーターアッセイ

これら 14 個の候補遺伝子が MYC プロモーター活性を制御しているかを検証するため、CRISPR activation system を適用して各遺伝子の gRNA を含むプラスミドを用いて Dual-Luciferase レポーターアッセイを行った。これらの候補分子のうち、CYP4v2、

ASPH、ANP32D、PCED1A、ABI1、FUZ、HOOK2 の 7 遺伝子は、対照と比較して統計的に有意に高いルシフェラーゼ活性を示し、その中でも ABI1、PCED1A、HOOK2、および CYP4v2 は 2 倍以上の高い活性を示した。そこで、これら 4 つの遺伝子の過剰発現ベクターを HEK293T 細胞に導入し、Dual-Luciferase レポーターアッセイを実行したところ、MYC プロモーターが活性化されることが示された。次に、定量的 PCR (qPCR) を実施して、短鎖干渉 RNA (siRNA) でこれらの遺伝子をノックダウンした OVSAHO 細胞における MYC の mRNA 発現を解析したが、いずれも有意な減少は示されなかった。



結論

CRISPR Library system を適用することにより、卵巣癌細胞株で MYC のプロモーターを活性化する 4 つの分子を同定した。しかし、分子生物学的な観点から、MYC 発現における包括的な制御システムを理解するには、さらに研究をを重ね正確かつ確実なスクリーニング技術を確立する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Yosuke, Kambayashi Hidetaka, Yamamoto Akiko, Onishi Ichihiro, Sugita Keisuke, Matsumura Miwa, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Yamamoto Kouhei, Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 23
2. 論文標題 Efficient Identification of the MYC Regulator with the Use of the CRISPR Library and Context-Matched Database Screenings	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7723 ~ 7723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147723	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 Yamamoto Akiko, Nagashima Takeo, Imai Yoshinari, Akitsu Kensuke, Yamanaka Zenta, Nishi Hirotaka	4. 巻 48
2. 論文標題 A case of recurrent endometrial cancer with long term complete remission following pembrolizumab induced severe immune related adverse event colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2630 ~ 2634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15346	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野理貴, 佐々木徹, 林 美鶴, 林 元茂, 山本阿紀子, 小野政徳, 西 洋孝
2. 発表標題 ニラバリブ使用中に重篤な汎血球減少により敗血症性ショックに至った一例
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 阿紀子
2. 発表標題 多彩な臨床症例を認め、複数の診療科との連携により基底細胞母斑症候群と診断し得た一例
3. 学会等名 第28回日本遺伝性腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 阿紀子
2. 発表標題 Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomachの1例
3. 学会等名 第28回日本遺伝性腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本阿紀子, 助田 葵, 三宅真司, 梶原真奈美, 永井 毅, 佐々木徹, 大村涼子
2. 発表標題 再発卵巣癌との鑑別に細胞診が有用であった横紋筋肉腫の一例
3. 学会等名 第63回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下優太, 山本阿紀子, 山中善太, 林茂空, 小野理貴, 大村涼子, 佐々木徹, 稲垣夏子, 西洋孝
2. 発表標題 当院におけるがんゲノム医療の現状と問題点
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井美成 山本阿紀子
2. 発表標題 Pembrolizumabが著効したがirAEによる重篤な大腸炎を発症した再発子宮体癌の一例
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会学術講演会
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
---------	---------