

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17105

研究課題名（和文）CRISPRスクリーニング法を用いたセツキシマブ耐性分子機構の解明

研究課題名（英文）A CRISPR Screening reveals resistance mechanisms to cetuximab therapy in OSCC.

研究代表者

喜田 晶洋 (Kita, Akihiro)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：60741816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌における放射線化学療法は、治療抵抗性（耐性）を獲得し腫瘍の根治は困難となることがある。解決のためには、薬剤・放射線耐性の問題のターゲットを、分子レベルで詳細かつ明確にすることが重要である。当初はセツキシマブに対する薬剤耐性遺伝子の解析を目的としていたが、臨床の現場において放射線耐性に対する評価の重要性も考え、まずは放射線耐性遺伝子の解析を行うこととした。本研究では新たなゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9を利用したゲノムワイドスクリーニング法を用いて、放射線耐性メカニズムに関連する遺伝子群を解析し、それらの遺伝子の中から耐性に関与する候補遺伝子の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当科は耐性に関する研究実績があり、先行実験による準備を整えて、耐性を克服する新規薬剤を開発する点に大きな特色と独創性がある。特に、実臨床において重要な課題である放射線耐性を克服する研究であり、過去の実績のように新規耐性克服薬の検索同定に成功すれば、非常に大きな社会的意義が得られる。よって本研究成果により、臨床的に新たな治療薬の開発、実用化の基盤となる非常に重要な情報を提供することで、癌治療、特に担癌状態の患者の社会復帰の維持・治療に大きな福音をもたらすことが期待でき、医学的にも社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：Since radiochemotherapy for head and neck cancer can develop resistance to the treatment, radical treatment of the tumors is sometimes difficult. To solve this problem, it is important to clarify the factors of drug- and radio-resistances at the molecular level. Although our initial goal was to analyze drug-resistance genes against cetuximab, we decided to first analyze radioresistance genes first, considering the importance of evaluation of radioresistance in clinical practice. In this study, we used a genome-wide screening method with CRISPR/Cas9 to identify genes related to radioresistance mechanisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR/CAS9 CRISPRスクリーニング法 放射線耐性 上皮成長因子受容体（EGFR）

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の治療において、治療効果の向上を目指して、いくつかの抗がん治療の組み合わせがしばしば行われる。なかでも放射線治療と抗がん剤の併用は、根治を目指す放射線治療のなかでその割合は増えつつある。化学療法としてはセツキシマブやシスプラチンなどが挙げられる。これらは実際の臨床での治療効果は明確ではなく、著効例においても、ある時期より抵抗性を獲得し腫瘍の根治は困難となる。また併用されることの多い放射線治療は、臓器機能の温存や形態維持をすることができるため、口腔扁平上皮癌の治療に大きな役割を果たしている。しかし、病期が上がるにつれて放射線に抵抗性を示すことから、治療成績は依然として不良であり、放射線治療抵抗性(耐性)に対する有効な治療法の開発が熱望されている。解決のためには、薬剤耐性・放射線耐性の問題のターゲットを、分子レベルで極めて詳細かつ明確にバリデイトすることが重要である。

近年、新たなゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を用いた、ゲノムワイドスクリーニング法(以下、CRISPR スクリーニング法)が脚光を浴びている。これはヒトのタンパク質をコードする約 2 万もの遺伝子を短時間に個別に破壊し、その変異細胞が示す異常を調べる強力なツールである。これを癌細胞株に適用することで、癌細胞の増殖に関わる生物分子学的機構が解明できる。今回、当初はセツキシマブに対しての薬剤耐性遺伝子の解析を目的としていたが、臨床の現場において放射線耐性に対する評価の重要性を考え、まずは放射線耐性遺伝子の解析を行うこととした。今回放射線に対する耐性株において、その耐性に必要な遺伝子の働きを強力に制御する薬を drug-repositioning の観点から同定出来れば、開発にかかる期間と費用も削減でき、その意義は極めて大きい。本研究で CRISPR/Cas9 を利用した機能欠損型スクリーニング法を用いて、放射線耐性メカニズムに関連する遺伝子群を解析し、それらの遺伝子の中から耐性に関与するキーとなる候補遺伝子を選別し、耐性克服薬の探索を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、化学療法と併用される放射線治療に着目し、まずは放射線耐性メカニズムに関与する遺伝子を網羅的に解析し同定するため、CRISPR スクリーニング法を用いたゲノムワイドノックアウトスクリーニングを行い、耐性関連遺伝子候補を明らかにする。またパスウェイ解析による遺伝子機能解析、臨床サンプルを用いた後ろ向き試験による遺伝子機能解析、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト細胞の作製による遺伝子機能解析により、感受性/耐性遺伝子を明らかにする。以上の結果から、放射線耐性メカニズムの詳細を明らかにし、耐性を克服する方法や薬剤を検索・同定することを目的とした。この放射線耐性メカニズムを踏まえて、今後 CRISPR スクリーニング法を用いて化学療法における薬剤耐性の評価も行っていく。

3. 研究の方法

(1) Cas9 と CRISPR sgRNA ライブラリーが含まれたレンチウイルスを放射線耐性細胞株に感染させ導入する。薬剤処理群(もともと耐性を示していた薬剤濃度で処理)と薬剤非処理群とで細胞培養し、抽出した gDNA より次世代シーケンサー(NGS)にて解析を行う。

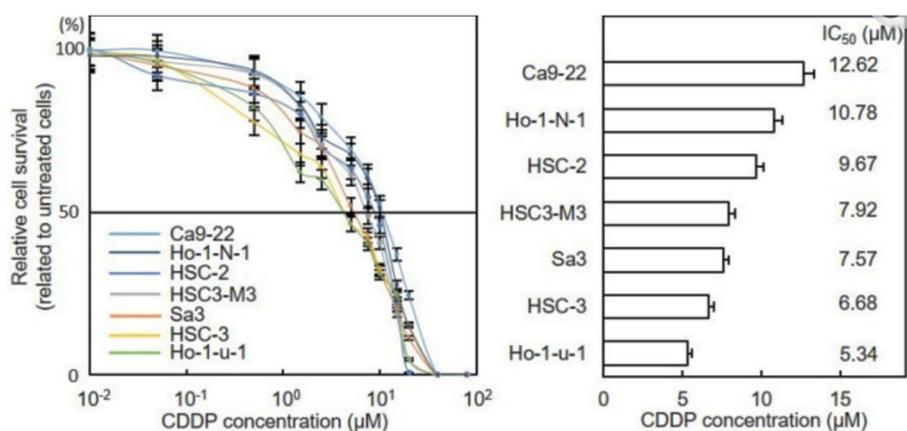
(2) 絞り込んだ遺伝子群について遺伝子パスウェイ解析ソフト(IPA ソフト)で遺伝子間の相互関係を解析し、有意な機能(細胞周期、細胞増殖、血管新生、細胞接着、代謝など)に強く関連した遺伝子ネットワークを形成する遺伝子群をさらに絞り込む

(3) これらの候補遺伝子群に関し、耐性/感受性と臨床的に関係している遺伝子を同定する。

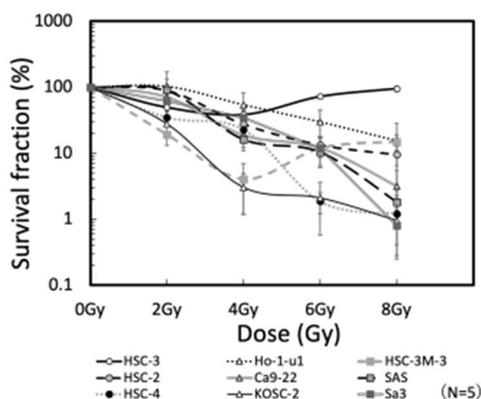
4. 研究成果

(1) Cas9 と CRISPR sgRNA ライブラリーが含まれたレンチウイルスを放射線耐性細胞株に感染させ導入する。薬剤処理群(もともと耐性を示していた薬剤濃度で処理)と薬剤非処理群とで細胞培養し、抽出した gDNA より次世代シーケンサー(NGS)にて解析を行う。

9つのOSCC細胞株の中からCDDP耐性細胞と放射線抵抗性細胞を同定した。CDDP耐性を評価するために0.01-1000 μM のCDDPで48時間処理後の細胞生存率を評価した。また放射線耐性を評価するために、0-8Gyで放射線を7日間照射し細胞生存率を評価した。

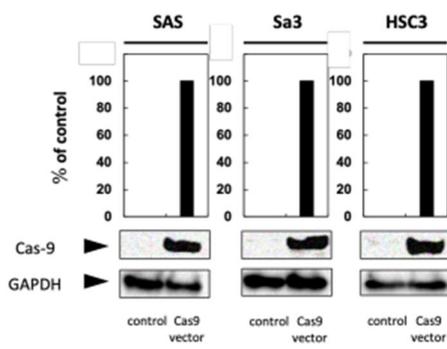


(図1) CDDP(0.01-1000 μM)で48時間処理後の細胞生存率

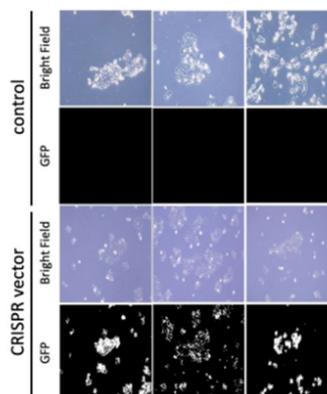


(図2) 放射線耐性株・感受性株の同定

さらにCDDP耐性株、放射線耐性株の同定を行い、Cas9発現株の樹立を試みた。放射線耐性株においてCas9安定発現株の作製を行うことができた。臨床の現場において放射線耐性に対する評価の重要性を考え、まずは放射線耐性遺伝子の解析を行うこととした。sgRNAライブラリーをCas9安定発現の放射線耐性株に対して形質導入し、先行実験で行なった耐性株樹立プロトコルに沿って放射線を暴露させ、耐性を示す細胞と感受性を示す細胞とを識別した。それら耐性・感受性細胞からゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーによってsgRNA頻度を算出した。



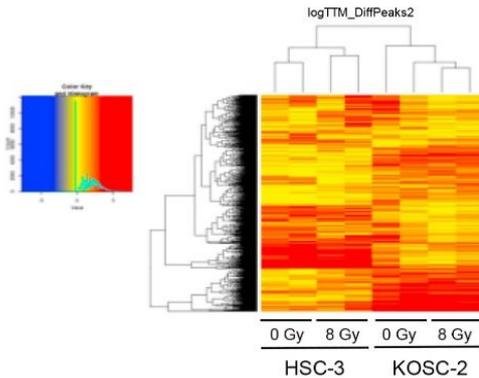
(図3) Cas9安定発現株の樹立



(図4) sgRNAライブラリーの形質導入

(2) 絞り込んだ遺伝子群について遺伝子パスウェイ解析ソフト (IPA ソフト) で遺伝子間の相互関係を解析し, 有意な機能に強く関連した遺伝子ネットワークを形成する遺伝子群をさらに絞り込む。

HSC-3 において, 235 の遺伝子を特定した。さらに, Gene Ontology 解析により遺伝子をシグナル伝達関連遺伝子として以下に挙げる選定した。



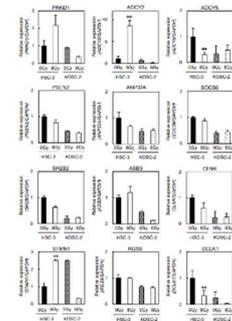
(図 5) Heatmap (HSC-3, KOSC-2)

| | |
|---------------|---|
| <i>PRKD1</i> | <i>Protein Kinase D1</i> |
| <i>ADCY2</i> | <i>Adenylate Cyclase 2</i> |
| <i>ADCY5</i> | <i>Adenylate Cyclase 5</i> |
| <i>PSEN2</i> | <i>Presenilin 2</i> |
| <i>ANP32A</i> | <i>Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member A</i> |
| <i>SOCS6</i> | <i>Suppressor Of Cytokine Signaling 6</i> |
| <i>SH2B2</i> | <i>SH2B Adaptor Protein 2</i> |
| <i>ASB3</i> | <i>Ankyrin Repeat and SOCS Box Containing 3</i> |
| <i>CLNK</i> | <i>Cytokine Dependent Hematopoietic Cell Linker</i> |
| <i>STMN1</i> | <i>Stathmin 1</i> |
| <i>RGS9</i> | <i>Regulator Of G Protein Signaling 9</i> |
| <i>DCLK1</i> | <i>Doublecortin Like Kinase 1</i> |

(図 6) Gene Ontology 解析による絞り込み

(3) これらの候補遺伝子群に関し, 耐性/感受性と臨床的に関係している遺伝子を同定する。

RT-qPCR により遺伝子の発現量を確認した。これら候補遺伝子群に関し, 耐性/感受性と臨床的に関係している遺伝子の探索を行った。HSC-3 において放射線照射後に有意に発現量が上昇していた *STMN1* や *ADCY2* は放射線耐性克服に大きく関与する可能性が考えられた。これらのうち *STMN1* は, 肺扁平上皮癌における化学療法抵抗性に関与しているとの報告がある。今回の解析により, *STMN1* は放射線耐性にも関与する可能性が高いことから, *STMN1* が放射線化学療法において関与する遺伝子として詳細な解析を行うのに有意な遺伝子であるとの結果となった。



(図 7) 遺伝子発現解析

まとめ:

頭頸部癌において放射線耐性克服についての研究は盛んに行われている。しかし, この耐性獲得, 克服についての詳細な機序, どの遺伝子が実際に治療標的となるかは不明な点が多い。CRISPR スクリーニング法は新しい技術のため, 放射線耐性細胞にゲノムワイドノックアウトスクリーニングが行われた報告は全く無い。耐性を規定する新たな遺伝子の同定は, 今後の治療効果予測, また耐性を示す腫瘍に対する標的治療の開発に貢献できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|