

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16323

研究課題名（和文）大規模ゲノミクスと機能的スクリーニングに基づく新規がん治療標的の探索

研究課題名（英文）Search for Novel Cancer Therapeutic Targets Based on Large-Scale Genomics and Functional Screening

研究代表者

平林 茂樹（Hirabayashi, Shigeki）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30910947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、血液腫瘍・がんに対する分子標的薬が開発されてきた。しかし、分子標的薬で治療しても治療抵抗性の細胞が増殖し、根治がしばしば困難である。したがって、本研究ではがんと正常細胞の生存に必須な遺伝子を同定することで、重篤な有害事象を抑えながらも多彩ながんに奏功する新規治療法の開発を目指している。まず、がんのデータベースよりがんの生存に重要な遺伝子を907遺伝子同定した。さらに、造血幹細胞においてスクリーニングを実施し、がんの生存には必須であるが、造血幹細胞の生存には必須ではない49遺伝子と不利な11遺伝子を同定した。今後、同定した遺伝子より有望な治療標的を見出したいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における死因の第一は悪性新生物、つまりがんである。したがって、がんの治療に貢献する研究は社会的な意義が大きい。本研究結果はがんの生存に必須な遺伝子と正常な造血幹細胞に必須ではない遺伝子を同定することで、がん細胞特異的な治療を目指すもので、本研究の成果は今後の治療困難な広範な種類のがんの治療につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, molecular targeted drugs have been developed for hematologic tumors and cancers. However, even with treatment using molecular targeted drugs, resistant cells often proliferate, making complete eradication difficult. Therefore, this study aims to develop new therapies that are effective against a wide range of cancers while minimizing severe adverse events by identifying genes essential for the survival of both cancer and normal cells. First, 907 genes crucial for cancer survival were identified from cancer databases. Additionally, screening in hematopoietic stem cells identified 49 genes essential for cancer survival but not for hematopoietic stem cell survival, along with 11 disadvantageous genes. In the future, I hope to identify promising therapeutic targets from the identified genes.

研究分野：システムゲノム科学

キーワード：がん 血液腫瘍 CRISPRスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで血液腫瘍の遺伝子変異や融合遺伝子に対する分子標的薬の創出により、血液腫瘍の治療成績は向上してきた。近年のシングルセル解析の発展により、腫瘍に不均一性があり、分子標的薬により腫瘍内の特定のクローンを死滅するもそれ以外の変異を有するクローンが増殖し、根治を妨げていることがわかってきた (Morita, Nat Commun 2020)。したがって、血液腫瘍を根治するためには如何にしてこの不均一なすべてのクローンを根絶するかということが重要である。実際、分子標的薬が発展した現在においても急性骨髄性白血病 (AML) の寛解導入療法の主たる薬剤は DNA ポリメラーゼの阻害作用を有する代謝拮抗薬のシタラビン、DNA ポリメラーゼとトポイソメラーゼ II の阻害作用を有する抗悪性腫瘍抗生剤のダウノルビシンやイダルビシンであり、それらは様々な白血球細胞のクローンを死滅するのに有用である。また、AML の中で予後不良であるものは、完全な白血球細胞の根絶を目指して、正常の造血幹細胞も含め根絶する強力な化学療法である前処置および造血幹細胞移植が実施される。前処置における薬剤も広範な細胞を傷害するアルキル化薬や代謝拮抗薬が主として使用される。また、AML だけでなく、急性リンパ性白血病 (ALL) や他の固形腫瘍においても同様に従来の化学療法が重要な位置を占める。しかし、これらの抗がん剤によりがん細胞だけではなく、正常細胞も傷害を受けることが問題である。特に、造血幹細胞の傷害は汎血球減少をもたらし、重篤な感染症やその関連死亡、および抗がん剤の投与量の減量・中止にもつながる。それゆえ、広範ながん細胞には作用し、正常の造血幹細胞には作用しない (もしくは作用が弱い) 薬剤を創出するには、がん細胞の生存に必須ではあるが、正常の造血幹細胞の生存に必須ではない遺伝子を標的とすることが重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は血液腫瘍細胞・がん細胞と正常造血幹細胞の生存に必須な遺伝子を同定し、重篤な血球減少を抑えながらも血液腫瘍を主とした多彩ながんに奏功する新規治療法の開発に寄与することである。

目的 1: がんの生存に必須な遺伝子の同定と生理的に重要な遺伝子の除外

近年、Broad と Sanger Institute によって約 900 種類のがん細胞株で CRISPR/Cas9 screening が実施された (Behan, Nature 2019; Meyers, Nat Genet 2017)。申請者はこのデータを利用し、AML、ALL および全がんにおける生存に必須な遺伝子を同定する。

目的 2: 造血幹細胞の生存に必須な遺伝子の同定と標的候補遺伝子の抽出

臍帯血由来の造血幹細胞に対して、CRISPR/Cas9 screening を行い、実験的に造血幹細胞の生存に必須な遺伝子を同定する。がん細胞と造血幹細胞への生存に及ぼす影響を比較し、がん細胞特異的に生存に関わる遺伝子を同定する。一方で、前処置の薬剤の標的候補遺伝子となるため、血液腫瘍細胞と造血幹細胞の両者共の生存に関わる遺伝子も同定する。

3. 研究の方法

がん細胞に必須な遺伝子の同定のために、がん細胞株の CRISPR/Cas9 screening のデータベースである Depmap よりデータをダウンロードし解析することで、AML、ALL、全がんに対する生存に必須な遺伝子をそれぞれ 813、823、834 個同定した。同定した遺伝子は重複しており、重複した遺伝子を除外した 907 遺伝子を標的として解析を進めた。

臍帯血から造血幹細胞・前駆細胞 (HSPC) を濃縮するために、抗体とビーズを用いた精製キットで CD34+細胞を臍帯血から濃縮した。臍帯血は九州大学産婦人科のご協力を得て、IRB 審査を通してから帝王切開が必要な児の臍帯から採取した。

907 遺伝子における CRISPR/Cas9 スクリーニングを実施する前に実際に HSPC で発現している CD45 をノックアウト可能か評価することとした。HSPC に CD45 をノックアウトするための single-guide RNA (sgRNA) を発現させるためのレンチウイルスを感染後、Cas9 タンパク質をエレクトロポレーションで導入し、ノックアウトしたものとしていないもので CD45 発現細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。

上記の系で CD34+細胞のノックアウトが可能なことを評価した後、907 遺伝子を標的とするプラスミドプールを作製し、次世代シーケンス (NGS) でプラスミドプールが問題なくできていることを確認した。このプラスミドプールを用いて sgRNA を発現させるレンチウイルスプールを作製した。レンチウイルスプールを HSPC に感染させることで、感染した細胞は Crimson が発現するので、Crimson の発現に基づきセルソーティングを行った。この細胞を input として一部保存した後残りの細胞に Cas9 タンパク質を導入した。Cas9 タンパク質導入後 14 日培養し、CD34+細胞を再度セルソーティングし output の細胞とした。Input と output の細胞からゲノム DNA を抽出し、ライブラリを作製した後 NGS を実施した。得られたデータを MAGeCK (Li, Genome Biology 2014) で解析し、HSPC の生存に必要な遺伝子とそうではない遺伝子を同定した。それぞれにどのような遺伝子が濃縮しているかを調べるために EnrichR (Chen, BMC Bioinformatics 2013) でエンリッチメント解析を行った。

4. 研究成果

通常のがん細胞株と比較して正常の CD34+細胞ではゲノム編集が難しいが、Guide Swap(Ting, Nature Methods 2019)という手法を用い臍帯血由来の HSPC において 92.3%の効率で CD45 のノックアウトが可能であった(図1)。次に 907 遺伝子のプラスミドライブラリを作製し、設計した全ガイド(3626sgRNAs)をクローニングできていることを確認した。実際に CRISPR/Cas9 screening を HSPC で実施し、ゲノム編集前とゲノム編集 14 日後を比較することでノックアウト(KO)により生存に有利に、もしくは不利になる遺伝子を同定した(図2: 赤丸の遺伝子は KO により生存に有利、青丸の遺伝子は KO により生存に不利)。HSPC の生存に有利な 49 遺伝子に濃縮している GO Biological process にはオルガネラや細胞内の pH 調整に関与する遺伝子、細胞周期の制御に関わる遺伝子、rRNA Processing に関わる遺伝子、リボソーム生合成に関わる遺伝子が有意に濃縮していた。正常細胞では嫌気条件下でのみ解糖系が働くが、がん細胞では好気条件下でも解糖系が生じる Warburg 効果が知られている。Warburg 効果によって乳酸が産生されるが、細胞内の pH は中性~弱アルカリ性であり、がん細胞外の pH は酸性である。がん細胞の pH 調整のために複数の遺伝子の発現が重要であり、その一方でアキレス腱となっている可能性が考えられた。一方、HSPC の生存に不利な 11 遺伝子に濃縮している GO Biological process には、Protein-RNA Complex Assembly、RNA splicing、mRNA Processing に関わる遺伝子が濃縮していた。これらの遺伝子群は造血幹細胞移植前の強力な化学療法である前処置の標的遺伝子として利用できる可能性がある。今後は今回同定した遺伝子の検証実験を行い、治療薬の創出につなげたいと考えている。

図1

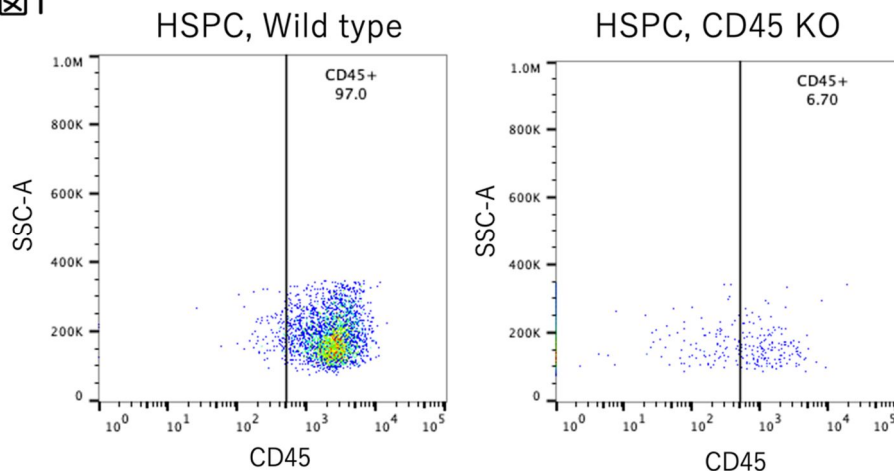
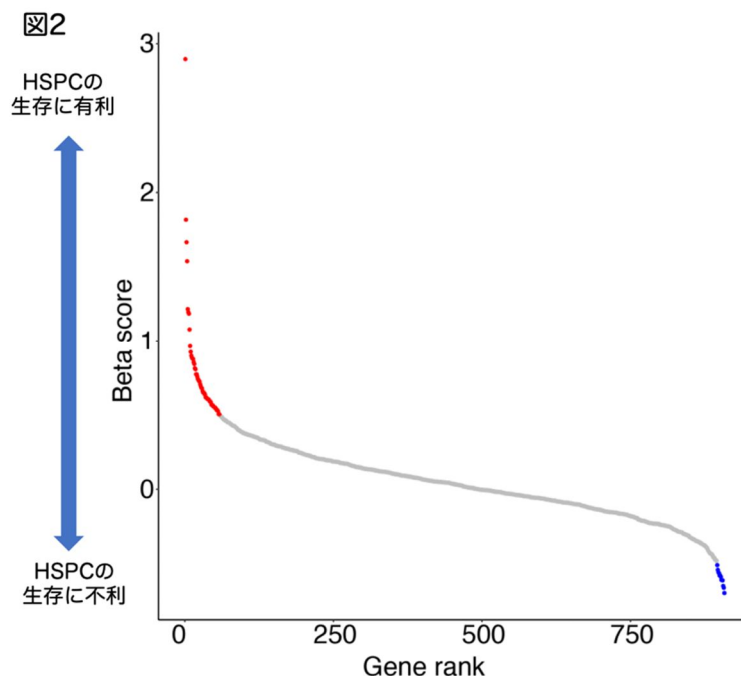


図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imanaga Hiroshi, Semba Yuichiro, Sasaki Kensuke, Setoguchi Kiyoko, Maniriho Hillary, Yamauchi Takuji, Terasaki Tatsuya, Hirabayashi Shigeki, Nakao Fumihiko, Nogami Jumpei, Izraeli Shai, Akashi Koichi, Takahiro Maeda	4. 巻 in press
2. 論文標題 Central role of the mTORC1 pathway in glucocorticoid activity against B-ALL cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood Neoplasia	6. 最初と最後の頁 100015 ~ 100015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bneo.2024.100015	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 該当する
1. 著者名 Hirabayashi Shigeki, Kondo Tadakazu, Nishiwaki Satoshi, Mizuta Shuichi, Doki Noriko, Fukuda Takahiro, Uchida Naoyuki, Ozawa Yukiyasu, Kanda Yoshinobu, Imanaka Ryota, Takahashi Satoshi, Ishikawa Jun, Yano Shingo, Nakamae Hirohisa, Eto Tetsuya, Kimura Takafumi, Tanaka Junji, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Kako Shinichi	4. 巻 98
2. 論文標題 Impact of <sc>MRD</sc> on clinical outcomes of unrelated hematopoietic stem cell transplantation in patients with Ph⁺<sc>ALL</sc>: A retrospective nationwide study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajh.27041	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 -
1. 著者名 Nakao Fumihiko, Setoguchi Kiyoko, Semba Yuichiro, Yamauchi Takuji, Nogami Jumpei, Sasaki Kensuke, Imanaga Hiroshi, Terasaki Tatsuya, Miyazaki Manaka, Hirabayashi Shigeki, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Masuda Takeshi, Akashi Koichi, Maeda Takahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting a mitochondrial E3 ubiquitin ligase complex to overcome AML cell-intrinsic Venetoclax resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-01879-z	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 -

1. 著者名 Jo Tomoyasu, Arai Yasuyuki, Kondo Tadakazu, Mizuno Shohei, Hirabayashi Shigeki et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 Advantages of peripheral blood stem cells from unrelated donors versus bone marrow transplants in outcomes of adult acute myeloid leukemia patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 1013 ~ 1025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2022.05.009	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 -

1. 著者名 Kanda Junya, Hirabayashi Shigeki, Yokoyama Hisayuki, Kawase Takakazu, Tanaka Hidenori, Uchida Naoyuki, Taniguchi Shuichi, Takahashi Satoshi, Onizuka Makoto, Tanaka Masatsugu, Sugio Yasuhiro, Eto Tetsuya, Kanda Yoshinobu, Kimura Takafumi, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Morishima Satoko	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of Multiple HLA Locus Mismatches on Outcomes after Single Cord Blood Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 398.e1 ~ 398.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2022.05.005	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 -

1. 著者名 Shimomura Yoshimitsu, Sobue Tomotaka, Hirabayashi Shigeki, Kondo Tadakazu, Mizuno Shohei et al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Comparing cord blood transplantation and matched related donor transplantation in non-remission acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1132 ~ 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01474-0	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 -

1. 著者名 Sakurada-Aono Maki, Sakamoto Takashi, Kobayashi Masayuki, Takiuchi Yoko, Iwai Fumie, Tada Kohei, Sasanuma Hiroyuki, Hirabayashi Shigeki, Murakawa Yasuhiro, Shirakawa Kotaro, Sakamoto Chihiro, Shindo Keisuke, Yasunaga Jun-ichirou, Matsuoka Masao, Pommier Yves, Takeda Shunichi, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 657
2. 論文標題 HTLV-1 bZIP factor impairs DNA mismatch repair system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 43 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.049	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 3件）

1. 発表者名 Wada F, Kato S, Bhagat S, Hirabayashi S, Son R, Oguchi A, Takeuchi K, Sekito S, Hirai T, Zhang Z, Horisawa Y, Iwasaki M, Takeda J, Kanda J, Sakamoto T, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Murakawa Y
2. 発表標題 Identification of Novel Transcripts and Potential Therapeutic Targets for Acute Leukemia
3. 学会等名 65th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Terasaki T, Semba Y, Sasaki K, Miyata K, Yamauchi T, Imanaga H, Nakao F, Hirabayashi S, Nogami J, Akahane K, Inukai T, Akashi K, and Maeda T
2. 発表標題 Genome-Wide CRISPR/Cas9 Screens Identify DDX19A/DDX19B As a Critical Regulator of Intrinsic Apoptosis By Regulating MCL1 mRNA Cellular Localization
3. 学会等名 65th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今永博、仙波 雄一郎、佐々木謙介、宮田喜代子、山内拓司、寺崎達也、中尾文彦、平林茂樹、野上順平、赤司浩一、前田高宏
2. 発表標題 GATOR1 complex is a critical regulator of glucocorticoid sensitivity in B-ALL cells
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾文彦、仙波雄一郎、宮田喜代子、山内拓司、野上順平、今永博、寺崎達也、宮崎眞佳、平林茂樹、増田豪、赤司浩一、前田高宏
2. 発表標題 Mitochondrial E3 ligase complex regulates venetoclax sensitivity via modulating BAX equilibrium
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今永博、平林茂樹、赤司浩一、前田高宏
2. 発表標題 CRISPRスクリーンによりB-ALLにおけるグルココルチコイド感受性の制御因子としてGATOR1complexを同定
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Imanaga, Yuichiro Semba, Kensuke Sasaki, Kiyoko Miyata, Takuji Yamauchi, Tatsuya Terasaki, Fumihiko Nakao, Shigeki Hirabayashi et al.
2. 発表標題 A Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screen Reveals GATOR1 Complex Is a Critical Regulator of Glucocorticoid Sensitivity in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting (国際学会)
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

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