

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16831

研究課題名（和文）CRISPR-Cas9スクリーニングによる卵巣奇形腫悪性転化の新規治療の開発

研究課題名（英文）Novel Therapies for Malignant Transformation of Teratomas Based on Comprehensive Genetic Screening

研究代表者

玉内 学志（Tamauchi, Satoshi）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50845097

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）：卵巣奇形腫悪性転化の細胞株を用いて、CRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニングを実施した。スクリーニングの選択圧としてシスプラチン添加を行った。ネガティブスクリーニングの結果、遺伝子Aの阻害化合物を細胞株に添加することで、細胞増殖が抑制されることを確認した。また、卵巣奇形腫悪性転化の患者腫瘍由来マウスモデルの腫瘍を多数のヌードマウスに分割移植して疑似患者集団を作成し、同化合物を腹腔内投与したところ、コントロール群に比して投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。以上から本研究で見出しされた治療標的遺伝子と、その阻害による新規治療開発というコンセプトの臨床応用性が実証される結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵巣奇形腫悪性転化の細胞株を用いたCRISPR-Cas9ノックアウトスクリーニングを通じて、新たな治療標的遺伝子を特定し、その阻害による治療法の有効性を検証した。シスプラチンを選択圧として使用し、遺伝子Aの阻害化合物が細胞増殖を抑制することを確認した。また、患者由来の腫瘍をヌードマウスに移植した疑似患者集団モデルを用いた実験では、同化合物の腹腔内投与により、腫瘍増殖が有意に抑制されることを示した。これにより、本研究で同定された治療標的遺伝子の阻害が新規治療の開発に繋がる可能性が示され、難治性希少がんである本疾患の予後改善につながる社会的意義のある成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：CRISPR-Cas9 knockout screening was performed using cell lines of ovarian teratoma malignant transformation. Cisplatin was used as a selection pressure for screening. Negative screening revealed 25 genes. Ten genes were identified as novel therapeutic target genes. 10 genes were subjected to knockdown experiments using cell lines and further sorted into 4 genes. Among them, we confirmed that the addition of an inhibitory compound for gene A to the cell lines inhibited cell proliferation. In addition, a xeno-patient population was created by dividing and transplanting tumors from a mouse model derived from a patient with malignant transformation of ovarian teratoma into a large number of nude mice, and intraperitoneal administration of the compound showed significant tumor growth inhibition in the treated group compared to the control group. These results demonstrate the clinical applicability of the therapeutic target genes identified in this screening.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 卵巣奇形腫悪性転化 CRISPR-Cas9スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣成熟嚢胞性奇形腫 (MCT) は最も頻度の高い卵巣腫瘍の一つであり、女性における生涯発症率は 10~20%とされている。MCT は良性腫瘍であるが、0.17~2%の頻度で悪性化することが知られており、この卵巣成熟嚢胞性奇形腫の悪性転化 (MTMCT) の進行症例は、非常に難治性であることが特徴である。それらの症例に対してこれまで様々な既存薬の投与が試みられてきたが、有効性が明らかとなった薬剤はなく、未だ標準的な薬物療法が未確立な疾患である。既存薬による治療抵抗性の MTMCT の生命予後は極めて不良であり、予後改善のため新規治療標的を探索し創薬する必要性が高い疾患である。一方で、MTMCT はこれまで細胞株や動物モデルが存在せず、新規治療標的探索などのトランスレーショナルリサーチは行われてこなかったが、研究代表者は MTMCT の PDX モデルを樹立し、その過程で、*in vitro* で継代・培養が可能な MTMCT の細胞株である『NOSCC1』も樹立し、世界で初めて樹立された MTMCT-PDX と細胞株のペアとして 2020 年に論文報告している。

2. 研究の目的

本研究では、この NOSCC1 に対して CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリを用いたノックアウトスクリーニングを行って新規治療標的分子の候補を同定し、治療標的としての実際の有望性を細胞株と PDX モデルを用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

NOSCC1 を用いた網羅的遺伝子スクリーニングとして sgRNA ライブラリを用いた CRISPR-Cas9 ノックアウトスクリーニングを行った。スクリーニングに際しては、MTMCT に対する抗癌剤として唯一推奨されているシスプラチンを selective pressure (選択圧) として用い、セレクション前後の生存細胞中の sgRNA 配列を次世代シーケンサで検出・解析した。セレクション後にリード数が増加する sgRNA 配列はシスプラチン耐性遺伝子に関連し (ポジティブスクリーニング)、リード数が低下する sgRNA 配列はシスプラチン存在化の細胞死に関連するため (ネガティブスクリーニング)、このスクリーニングによってシスプラチンとの合成致死性やシスプラチン耐性腫瘍の生存に関連する治療標的遺伝子を見出すことができると考えられた。得られた治療標的遺伝子については、阻害剤の有無や創薬可能性の観点から絞り込みを行い、細胞株を用いた *in vitro* の系と、PDX を用いた *in vivo* の系で腫瘍増殖抑制効果を検証した。

4. 研究成果

ネガティブスクリーニングの結果、25 個の遺伝子が見出された。創薬可能性の観点から絞り込みを行い、10 個の遺伝子が新規治療標的遺伝子として同定された。

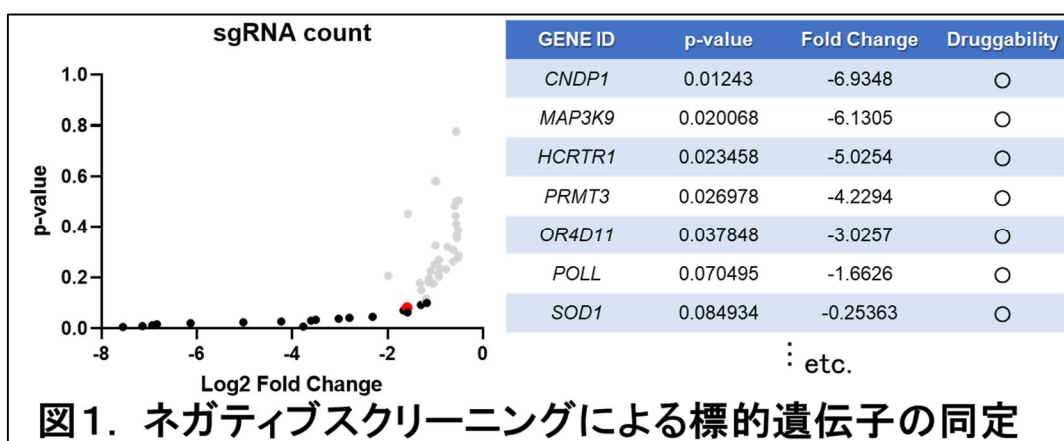
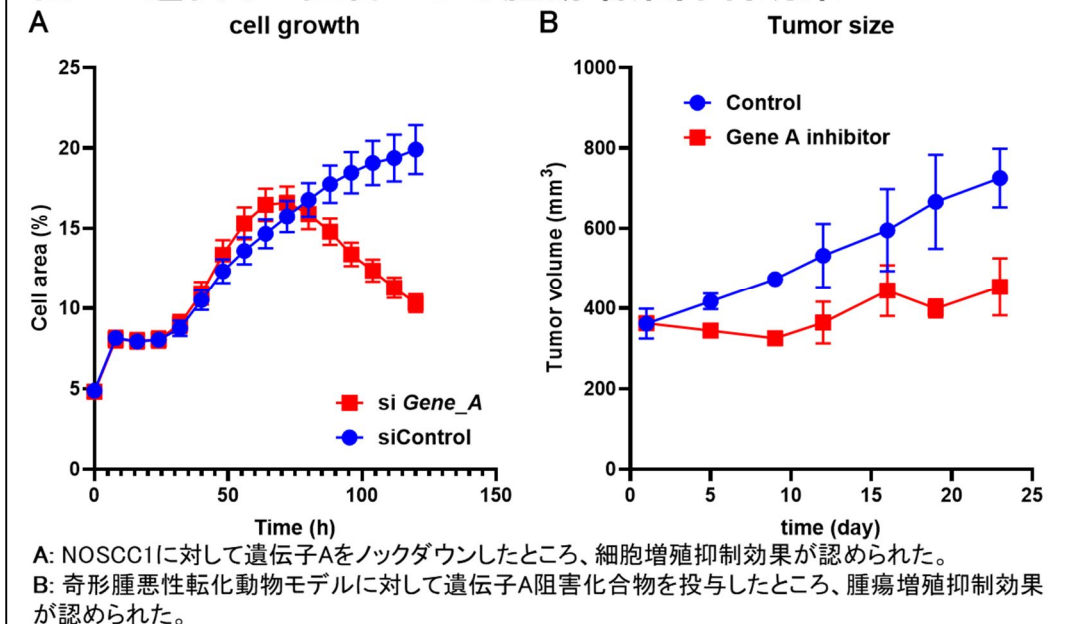


図1. ネガティブスクリーニングによる標的遺伝子の同定

10 個の遺伝子について、細胞株を用いたノックダウン実験を行い、さらに 4 種類の遺伝子へと選別を行った。その中で遺伝子 A の阻害化合物を細胞株に添加することで、細胞増殖が抑制されることを確認した。また、卵巣奇形腫悪性転化の患者腫瘍由来マウスモデルの腫瘍を多数のヌードマウスに分割移植して疑似患者集団を作成し、同化合物を腹腔内投与したところ、コントロール群に比して投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。このことから、本研究で見出された治療標的遺伝子と、その阻害による新規治療開発というコンセプトの臨床応用性が実証される結果が得られた。前述の阻害化合物を添加した細胞株と患者腫瘍由来モデルへの投薬実験で得られた腫瘍について網羅的解析を行っており、遺伝子 A の阻害が奇形腫悪性転化において治療効果を発揮するメカニズムを今後も検証を行う予定である。

図2. 遺伝子A阻害による腫瘍増殖抑制効果



また、残りの3遺伝子についても阻害化合物を探索しており、同様のアッセイを行うことで奇形腫悪性転化に対する特異的な治療戦略を今後複数提案できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉内 学志
2. 発表標題 CRISPR-Cas9 in vivo screening for novel therapy for malignant transformation of mature cystic teratoma of the ovary
3. 学会等名 第82回日本癌学会
4. 発表年 2023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
---------	---------