課題番号	22若8

若手研究者助成金　実績報告書

令和　6年　4月　10日

氏　　名：　岡崎　章悟
所属・資格：　歯学部・助教
実施研究所：　歯学部・総合歯学研究所

1　研究課題

和文表記（40字以内）
癌ゲノム医療の基盤となる革新的癌モデルの開発

英文表記
Development of an innovative cancer model for cancer genome medicine

2　研究期間

令和5年度
※令和4年度　～　令和5年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

ゲノム解析技術の発展により、個々の腫瘍の遺伝子変異に基づき適した治療法を選択する「癌ゲノム医療」が現実となりつつある。しかし、既存の治療法の適応となる遺伝子変異は限られており、治療法が未確立の遺伝子変異に対する新規治療法が求められている。そのために、多様な遺伝子変異パターンを横断的に比較解析し、遺伝子異常に基づき癌の性状を理解することが重要となる。しかし、現状のマウス癌モデルにおいては、多様な遺伝子変異パターンを比較することは現実的ではない。本研究では、癌ゲノム医療時代における癌研究の基盤構築のため、PiggyBacシステムによる遺伝子発現、CRISPR/Cas9システムによる遺伝子ノックアウト、ピンセット型電極によるin vivoエレクトロポレーション法などの最新の手法を組み合わせることにより、膵癌、乳癌、大腸癌、膀胱癌、口腔扁平上皮癌などの多くの癌に応用可能かつ、多様な遺伝子変異パターンを比較解析可能な革新的癌モデルの作製を目指す。

課題番号	22若8

4　研究概要

（背景）近年のゲノム解析技術の発展により、個々の腫瘍における遺伝子変異を安価かつ迅速に解析可能になり、悪性腫瘍の遺伝子変異パターンに基づき治療を行う、「癌ゲノム医療」が現実のものとなりつつある。しかし、治療標的となる遺伝子変異は限られており、治療法の確立されていない遺伝子変異に有効な新規癌治療法開発のため、遺伝子変異に基づく癌の性状理解の重要性が高まっている。一方、遺伝子変異パターンと癌の性状の関連性を解明するためには、多様な遺伝子変異パターンを横断的に比較・解析する必要がある。しかし、現在用いられている遺伝子改変マウスによる発癌モデルにおいてこのような解析を行う場合、複数の遺伝子改変マウスの維持・交配が必要となるが、現実的ではなく、解析が進んでいないのが現状である。そこで、本研究では、遺伝子変異パターンが癌の性状に及ぼす影響の解明に向けた、革新的な新規癌モデルの開発を試みる。

（方法）従来、癌研究に主に用いられてきた、遺伝子改変マウスを用いた発癌モデルと、発癌物質の投与による化学発癌モデルでは遺伝子変異パターンに基づく癌の性状解析は困難であった。例えば、遺伝子改変マウスモデルにおいて多様な変異を比較・解析するためには、多数の系統のマウスを維持・交配する必要があり、非現実的である。また、化学発癌モデルは遺伝子変異が不明確であり、特定の遺伝子変異と癌の特性を比較解析することは難しい。本研究では、上記課題を克服するため、高効率に遺伝子ノックアウト可能な CRISPR/Cas9 システム、レトロトランスポゾンを応用することで高効率かつ永続的な遺伝子発現が可能な PiggyBac システム、ピンセット型電極による in vivo エレクトロポレーション法を組み合わせることにより、野生型マウス局所に遺伝子変異を導入し、発癌を誘導する新規癌モデル作製することで、従来のモデルでは困難であった、遺伝子変異パターンの違いが癌の性状に及ぼす影響の解明に向けた基盤構築を試みる。

以下はその詳細である。

1. 遺伝子導入条件の検討：蛍光タンパク質発現 PiggyBac ベクターを用い、エレクトロポレーション法による遺伝子導入後の蛍光タンパク質発現効率を検討し、各組織における遺伝子導入の至適条件を検討する。また、長期に蛍光タンパク質発現が維持されることも確認する。

2. 発癌誘導因子の同定：癌モデルの作製においては腫瘍形成に必要な遺伝子変異の選定が課題となる。本研究においては、腫瘍形成に必要な遺伝子変異を同定するため、癌遺伝子を発現する PiggyBac ベクターに加え、複数の癌抑制遺伝子に対する gRNA 発現ベクターをミックスし、遺伝子導入を行う。導入直後は各細胞において多様な遺伝子変異が生じるが、腫瘍形成能を獲得した細胞のみがクローン増殖し、腫瘍を形成する。その後、腫瘍の遺伝子変異を解析することで、腫瘍形成に必要な遺伝子変異を同定する。導入する遺伝子変異は癌ゲノム解析の大規模臨床データベースである The Cancer Genome Atlas の変異解析データをもとに選択し、その遺伝子変異パターンを反映した複数種類の癌モデル作製を試みる。

課題番号	22若8

5　研究結果

本研究では、*In vivo* エレクトロポレーション法による PiggyBac ベクターの導入による様々な組織に由来する癌モデルの作製を試みたが、まず初めに、遺伝子導入が比較的容易である、皮膚および舌に癌を生じるモデルの樹立を試み、下記の実験を行った。

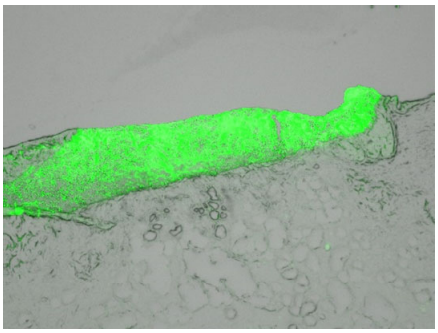


図1．皮膚における In vivo エレクトロポレーションによる GFP 発現

① *In vivo* エレクトロポレーション法の条件検討

In vivo エレクトロポレーションによる発がん誘導においては、高い遺伝子導入効率が必要となることから、まず、皮膚において、GFP 発現ベクターによる遺伝子導入法の検討を行った。また、ヒアルロニダーゼがエレクトロポレーションの効率を向上させるとの報告があったため、ヒアルロニダーゼ投与の有無による遺伝子導入効率の比較を行った。C57BL/6 マウス皮下にヒアルロニダーゼを投与し、その 1 時間後、ヒアルロニダーゼ投与部位および非投与部位に GFP 発現ベクターを投与した。その後、ピンセット型電極で皮膚を挟み、エレクトロポレーターNEPA21 によるエレクトロポレーションを行った。その 5 日後に皮膚組織の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡による GFP 発現の検討を行った。その結果、ヒアルロニダーゼ非投与部位においては明らかな GPF 発現は認められなかったが、ヒアルロニダーゼ投与部分においては、GFP の発現が認められた（図 1）。同様に、舌においてもヒアルロニダーゼ投与後に GFP 発現ベクターを投与し、エレクトロポレーションを行ったところ、皮膚と比較すると発現効率は劣るものの、舌組織においける GFP 発現が確認された。以上の結果より、ヒアルロニダーゼ投与と *In vivo* エレクトロポレーションを組み合わせることにより、皮膚及び舌へのベクター導入が可能であることが示された。

② 遺伝子発現誘導およびノックアウトベクターの作製

皮膚および舌へのベクター導入による発がん誘導実験をおこなうため、TCGA データベースを用いた、口腔扁平上皮癌において高頻度に変異・過剰発現などの遺伝子異常が認められる遺伝子を検討した。その結果、PIK3CA の遺伝子増幅もしくは活性化変異は半数近くの腫瘍に認められ、また、CCND1 または EGFR の過剰発現は 20-30%程度の腫瘍において認められた。機能欠損を生じる遺伝子異常としては、TP53 において約 70%、CDKN2A において約 50%、FAT1、NOTCH1、KMT2D において約 20%で認められた。そのため、PiggyBac システムにより過剰発現を誘導する遺伝子として変異型 Pik3ca、Ccnd1、EGFR を、CRISPR/Cas9 システムにてノックアウトする遺伝子として、Trp53、Cdkn2a、Fat1、Notch1、Kmt2d を選択した。次に、PiggyBac システムによる変異型 Pik3ca、Ccnd1、EGFR およびポジティブコントロールに用いる蛍光タンパク質 EGFP とピューロマイシン耐性遺伝子の発現を誘導するベクター、さらには CRISPR/Cas9 による Trp53、Cdkn2a、Fat1、Notch1、Kmt2d の欠損を誘導するベクターの設計及び作製を行った（図 2）。

課題番号	22 若 8

〔5　研究結果（つづき）〕

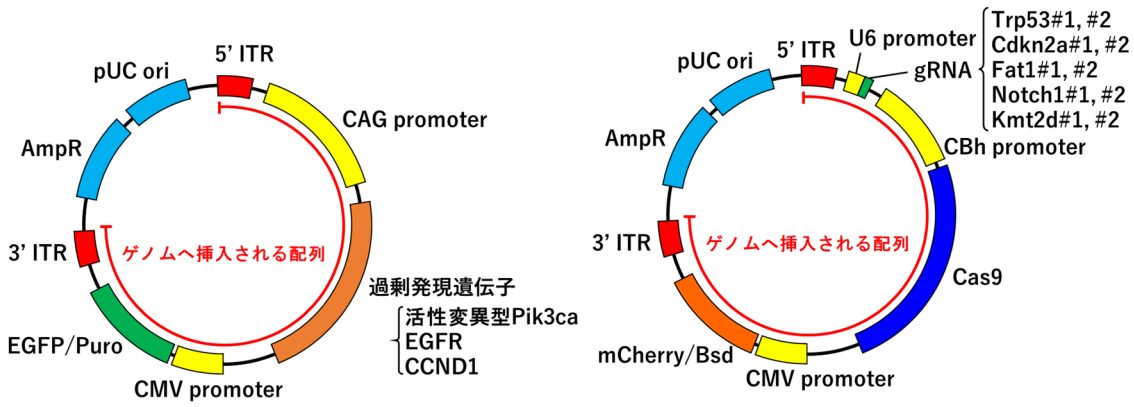


図 2．本研究で作製した遺伝子過剰発現（左）およびノックアウト PiggyBac ベクター（右）。

③ HEK293T 細胞を用いた PiggyBac システムの検討

作製した EGFP・ピューロマイシン耐性遺伝子発現 PiggyBac ベクターを用い、HEK293T 細胞にトランスポザーゼ発現ベクターとのコトランスフェクションを行うことで、長期的な EGFP およびピューロマイシン耐性遺伝子発現が維持されるか検討を行った。EGFP・ピューロマイシン耐性遺伝子発現 PiggyBac ベクターを、単独、もしくは PiggyBac トランスポザーゼベクターとのコトランスフェクションによる HEK293T 細胞への遺伝子導入を行い、トランスフェクション 3 日後より薬剤セレクションを行った。その結果、薬剤選択後においても多くの細胞が残存し、また、長期的な EGFP 発現も認められ、PiggyBac システムを用いたゲノムへの外来遺伝子挿入による効率的かつ長期的な遺伝子発現が可能であることが確認された（図 3）。

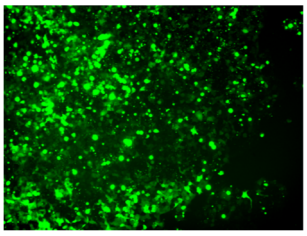


図 3．トランスフェクション 6 日後の HEK293T 細胞における EGFP 発現

④*in vivo* エレクトロポレーションによる癌形成の検討

作製したベクターを下記の組み合わせにて *in vivo* エレクトロポレーションによる遺伝子導入を行い、舌癌を発症するか検討を行った。

・活性変異型 Pik3ca ＋ 作製したノックアウトベクター10 種類のミックス
・活性変異型 Pik3ca + Trp53 ノックアウトベクター2 種類のミックス
・Ccnd1 ＋ 作製したノックアウトベクター10 種類のミックス
・Ccnd1 + Trp53 ノックアウトベクター2 種類のミックス

その後、２～３ヶ月にわたり、経過観察を行った。しかし、発癌に至るマウスは認められなかった。現時点で発症の認められない原因として、追跡期間の不足、遺伝子導入効率の不足、免疫原性による拒絶等が考えられる。引き続き経過観察を継続しつつ、遺伝子導入効率の改善や免疫不全マウスを用いた検討を行うことを計画している。また、マウス舌組織のオルガノイド

培養等の手法を用い、*in vitro* で遺伝子導入した後にマウスへ移植を行う手法による癌モデルの作製についても行う予定である。

課題番号	22若8

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

科学研究費基盤研究（B）・挑戦的研究（萌芽）、JST、AMEDの若手向け研究費、上原記念生命科学財団や武田科学振興財団等などの民間の研究費

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
なし				

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
岡﨑章悟、中島由梨佳、後飯塚僚、他	第８２回日本癌学会学術総会	Regulation of oral squamous cell carcinoma differentiation via HTR7/G12 signaling	2023年9月
中島由梨佳、岡﨑章悟、佐藤秀一、他	第８２回日本癌学会学術総会	Establishment of an oral squamous cell carcinoma periodontopathogenic bacteria co-culture system using spheroid culture	2023年9月
岡﨑章悟、中島由梨佳、今井健一	第６５回歯科基礎医学会学術大会	セロトニン受容体 HTR7 による口腔扁平上皮癌の分化制御	2023年9月
中島由梨佳、岡崎章悟、田村宗明、他	第６５回歯科基礎医学会学術大会	スフェロイド培養を用いた口腔扁平上皮癌-歯周病原性細菌共培養系の樹立	2023年9月

9　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Udagawa H., Nilsson M., Okazaki S., *et. al.*	J. Thorac. Oncol./ HER4 and EGFR activate cell signaling in NRG1 fusion-driven cancers: implications for HER2/HER3-specific vs. pan-HER targeting strategies	19巻1号	2023年9月	Elsevier
Sawabe A., Okazaki S., Nakamura A., *et. al.*	J. Leukoc. Biol./ The orphan G protein-coupled receptor 141 expressed in myeloid cells functions as an inflammation suppressor	In press	2024年1月	Society for Leukocyte Biology

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

なし

課題番号	22若8

１１　他の研究への発展

本癌モデルは同所性に腫瘍を誘導するものであるが、将来的な発展の一つとして、口腔内細菌叢と口腔扁平上皮癌の相互作用など、腫瘍細菌叢相互作用の解析への応用を考えている。現在、腫瘍細菌相互作用解析のための共培養系の樹立や、口腔内微小環境が口腔扁平上皮癌の進展に及ぼす影響についての解析も進めており、その成果として *Porphyromonas gingivalis* などの腫瘍関連細菌と口腔扁平上皮癌の共培養系を樹立した（論文投稿準備中）。本癌モデル樹立後は、腫瘍・細菌共培養系等を用いた腫瘍細菌叢相互作用解析を進めることを計画している。

１２　その他の成果

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。