

Title	CRISPR/Cas9ゲノム編集とオルガノイドを用いた早期乳癌の進行機序解明
Sub Title	The elucidation of mechanism of early breast cancer progression by CRISPR/Cas9 genome editing and organoid models
Author	関, 朋子(Seki, Tomoko) 永山, 愛子(Nagayama, Aiko) 林田, 哲(Hayashida, Tetsu)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究は、非浸潤性乳管癌（DCIS）が浸潤性乳管癌（IDC）へ進展する機序を解明し、正確なリスク評価と個別化医療の実現を目的とした。DCISとIDCの遺伝子変異を比較するため、160遺伝子パネルを用いて321検体を解析し、PIK3CAやTP53の主要変異を同定した。TP53変異はIDCのhigh grade腫瘍に多く、DCISでは稀で、組織型やgradeにより変異頻度が異なる可能性が示唆された。さらにCRISPR/Cas9全ゲノムKOスクリーニングにより19の関連遺伝子を特定し、TAS2Rの欠損がDCISの増殖を促進することを確認、P-mTORの発現亢進からmTOR経路の関与が示された。 This study aimed to investigate how ductal carcinoma in situ (DCIS), a non-invasive early-stage breast cancer, progresses to invasive ductal carcinoma (IDC), with the goal of advancing personalized treatment by reducing unnecessary surgeries and developing effective therapies. A 160-gene targeted sequencing panel analyzed 321 breast cancer samples (246 IDC and 75 DCIS), identifying major mutations such as PIK3CA and TP53. TP53 mutations were frequent in high-grade IDC but rare in DCIS, suggesting mutation frequency depends on grade and histology. A CRISPR/Cas9 whole-genome knockout screen using DCIS-derived cell lines identified 19 genes related to proliferation and malignancy. Among them, TAS2R gene loss enhanced DCIS cell growth. Western blot of TAS2R knockout cells showed increased phosphorylated mTOR, indicating mTOR pathway activation. These findings suggest TAS2R as a potential regulator of DCIS progression and therapeutic target.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2022～2024 課題番号：22K08761 研究分野：乳癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K08761seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K08761

研究課題名（和文）CRISPR/Cas9ゲノム編集とオルガノイドを用いた早期乳癌の進行機序解明

研究課題名（英文）The elucidation of mechanism of early breast cancer progression by CRISPR/Cas9 genome editing and organoid models

研究代表者

関 朋子（SEKI, Tomoko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：70528900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、非浸潤性乳管癌（DCIS）が浸潤性乳管癌（IDC）へ進展する機序を解明し、正確なリスク評価と個別化医療の実現を目的とした。DCISとIDCの遺伝子変異を比較するため、160遺伝子パネルを用いて321検体を解析し、PIK3CAやTP53の主要変異を同定した。TP53変異はIDCのhigh grade腫瘍に多く、DCISでは稀で、組織型やgradeにより変異頻度が異なる可能性が示唆された。さらにCRISPR/Cas9全ゲノムKOスクリーニングにより19の関連遺伝子を特定し、TAS2Rの欠損がDCISの増殖を促進することを確認、P-mTORの発現亢進からmTOR経路の関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、乳癌の早期病変であるDCISが浸潤癌へと進展する分子機構を解明し、正確なリスク評価と個別化医療の実現を目指す。遺伝子解析およびCRISPR/Cas9スクリーニングにより、進展に関与する新規分子としてTAS2Rが同定され、mTOR経路を介した細胞増殖の関与が示唆された。これにより、増殖リスクの高いDCISと低リスク群を識別できる可能性が広がる。不要な手術を回避し、リスクに応じた管理を実現することで、患者の身体的・精神的負担を軽減し、医療資源の効率的運用にも寄与することが期待される。乳癌診療の質およびQOLの維持・向上を図るうえで、社会的に意義の大きい研究といえる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate how ductal carcinoma in situ (DCIS), a non-invasive early-stage breast cancer, progresses to invasive ductal carcinoma (IDC), with the goal of advancing personalized treatment by reducing unnecessary surgeries and developing effective therapies. A 160-gene targeted sequencing panel analyzed 321 breast cancer samples (246 IDC and 75 DCIS), identifying major mutations such as PIK3CA and TP53. TP53 mutations were frequent in high-grade IDC but rare in DCIS, suggesting mutation frequency depends on grade and histology. A CRISPR/Cas9 whole-genome knockout screen using DCIS-derived cell lines identified 19 genes related to proliferation and malignancy. Among them, TAS2R gene loss enhanced DCIS cell growth. Western blot of TAS2R knockout cells showed increased phosphorylated mTOR, indicating mTOR pathway activation. These findings suggest TAS2R as a potential regulator of DCIS progression and therapeutic target.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 DCIS CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人女性の乳癌罹患率は悪性腫瘍の中で第1位であり、年間約9万人が罹患している。特に40歳代から60歳代女性の罹患率が高く、働く世代・子育て世代での罹患による社会へのインパクトが大きい。乳癌の予後は病期によって大きく異なり、10年生存率は早期癌である0期が100%、I期が95.3%、II期が85.8%であるのに対して、進行癌であるIII期が55.4%、IV期は15%となっている。そのため、乳癌の診療はいかに早期癌を根治させ、再発・転移を防ぐかが重要と考えられる。

乳癌の多くは、乳管上皮細胞から発症する乳管癌であり、乳管は腺上皮細胞と筋上皮細胞の2種類の細胞で構成される。筋上皮細胞は管腔構造の外側にあり、基底膜で取り囲まれている。非浸潤性乳管癌 (Ductal carcinoma in situ, DCIS) は乳管内に局限した腫瘍細胞の増殖と定義され、基底膜の連続性が失われて間質浸潤に至ったものが浸潤性乳管癌 (Invasive ductal carcinoma, IDC) と定義される (図1)。DCISの標準的な治療は、手術による切除と温存乳房に対する放射線照射が施行され、予後は極めて良好である。一方で、DCISの一部は増殖が遅く、経過観察のみでも生存に悪影響を与えないと考えられるものから、比較的増殖が速く、浸潤癌ないし転移性腫瘍に移行する危険性があるものまで、異なる振る舞いを示すことが報告されている。

研究代表者は、現在に至るまで一貫して乳癌外科医として乳癌の診療に携わってきた。本邦において診断される乳癌の約8割が予後の良い早期乳癌であり、根治が見込める状況である一方、乳房切除を望まない患者の予後を正確に予測したり、手術以外の選択肢を提示したりすることが困難であることを痛感してきた。そのため、最も早期の乳癌であるDCISがいかにIDCに進行するかを明らかにするプロジェクトの着想に至った。

本研究において、1) どのようなメカニズムでDCISはIDCに進行するのか、DCISとIDCの遺伝子変異や遺伝子発現の違いを確認することでその違いを確認することが出来るのか、2) DCISの細胞株モデルであるMCF10DCISに対するゲノム編集knockout (KO) screenをすることで、IDCへの進行に必須な責任遺伝子の候補を同定できるか、3) より生体に近い*in vivo*やオルガノイドモデルを用いてDCISからIDCへの進行メカニズムを確認できるか、の3点を解明することを目指した。

2. 研究の目的

DCISは手術等の現在の標準治療が過剰治療である可能性がある一方で、治療介入によって転移・死亡へ発展する可能性を持つ浸潤癌への進行を防ぐ必要性もあると考えられる。そのため、どのようなメカニズムでDCISからIDCに進行するのかを明らかにし、それを患者個人個人の腫瘍において予測することでovertreatmentとundertreatmentを回避して適切な治療を行う個別化医療の実現が本研究の目的とした。

本研究は下記の3つの研究計画に基づいてDCISからIDCへの進行の原理を明らかにすることを課題とした。1) 患者検体のクリニカルシーケンシングを用いたDCISとIDCの遺伝子変異・遺伝子発現の違いを明らかにする。2) *in vitro*でのDCISモデルを用いたCRISPR/Cas9 KO screeningで細胞増殖・悪性化の進行に必要と考えられる遺伝子を同定する。3) DCISのオルガノイドモデル、*in vivo*のマウスモデルを用いた癌細胞増殖機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) DCISとIDCのクリニカルシーケンシング

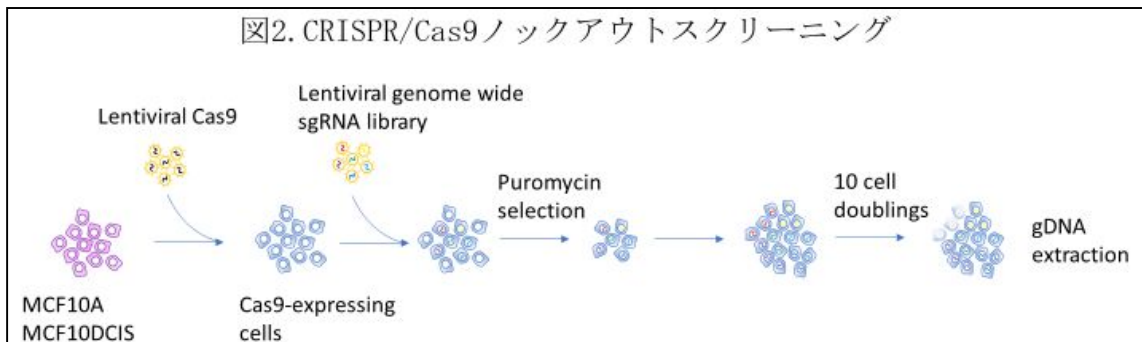
患者検体を用いたクリニカルシーケンシングによってDCISとIDCの遺伝子変異・遺伝子発現の違いを明らかにすることを目的とした。本計画では、慶應義塾大学医学部で行われている癌関連160遺伝子パネルを用いた“PleSSION Rapid Test”のデータを用いた解析を行った。当施設で手術切除を施行されたDCIS及びIDC検体、合計約320例を用いて、臨床病理学的特徴と腫瘍の遺伝子変異やコピー数変化のプロファイルとの関係性を評価した。IDCの遺伝子変異はThe Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータセットでも詳細に解析がなされているが、DCISの腫瘍は殆ど含まれておらず、本プロジェクトの新規性が期待されると考えられた。また、当院の手術検

図1. 非浸潤性乳管癌から浸潤性乳管癌への進行



体のうち、十分な腫瘍量が確保された DCIS 検体について、ホルモン受容体陽性 (HR)・HER2 陰性 (Luminal A type)、HR 陽性 HER2 陽性 (Luminal B-HER2 type)、HR 陰性 HER2 陽性 (HER2 type)、HR 陰性 HER2 陰性 (Triple negative type) のサブタイプそれぞれ 3 例ずつを抽出し、全エクソーム解析を行い、サブタイプごとの遺伝子変異の頻度を確認した。

(2) *In vitro* での DCIS モデルを用いた CRISPR/Cas9 knockout screening



*In vitro*でのMCF10DCISの細胞株を用いた whole genome KO screenを行うことで、細胞増殖に関与する遺伝子を同定することを目的とした。CRISPR/Cas9はRNA誘導型のゲノム編集技術であり、約2万個の全遺伝子を pooled screen で迅速かつ正確にKOすることを可能にした。この技術では、特定の染色体標的部位に対して特異的な sgRNA をガイドに、Cas9ヌクレアーゼ存在下で染色体上にDNA二本鎖切断を起こすことで変異体をKOへと導く。まずCas9を安定的に発現する細胞株を作成した。Cas9-MCF10DCISにレンチウイルスを用いて whole genome KO library を感染させた。Higromycinで感染細胞のみを選択した後、細胞培養を行い最終産物からgDNAを抽出し、それぞれのguide RNAに付随したバーコードをPCR増幅させ、次世代シーケンサーの解析により、どの遺伝子がKOされた結果増殖能が増したのかを解析した。確認された候補遺伝子は、再度CRISPR/Cas9を用いたKOを行って、実際の表現型の変化を確認する validation study を行った。

(3) DCISのオルガノイドモデルの確立および *in vivo* モデルでの検証

オルガノイドは3D構造を有する「*in vitro*で作られたミニ臓器」である。オルガノイドは立体的な培地内で形成され、実際の臓器の極性を含めた構造を持ち、自己複製能を有するため正常組織または癌組織由来の細胞株よりも正確なモデルと考えられている。DCISは定義上、間質浸潤を伴わない乳管内の腫瘍細胞の増殖が病態であるため、腫瘍細胞を取り囲む筋上皮細胞や基底膜といった癌微小環境が癌の増殖を制御している可能性が示唆される。乳管の管腔構造を再現できるオルガノイドをモデルにDCISからIDCへの進行を観察するのは新規性が高く、非常に有用と考えられた。本研究計画では、同意を得た患者の手術検体(生検体)から腫瘍細胞を採取し、オルガノイド樹立・培養を行った。培養に成功したオルガノイドの増殖能、浸潤能、免疫染色による蛋白発現を確認することで表現型を予測した。また、樹立したオルガノイドモデルに、前述の研究計画で明らかになったDCISの増殖の責任遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術で操作し、実際に増殖能や浸潤能が獲得されたかを確認することを予測した。

また、(2)で同定されたDCIS増殖責任遺伝子のKO細胞株と親株をマウスのmammary fat padに注入し xenograft modelでの腫瘍増殖能の確認を行うことを予測した。

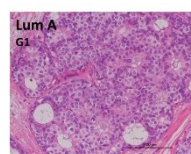
4. 研究成果

(1) DCISとIDCのクリニカルシーケンシング

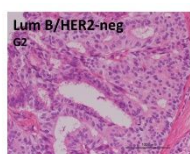
本研究では、2018年10月以降に当施設で腫瘍切除を受け、臨床研究「PleSSision-Rapid Test」に同意した乳癌患者の腫瘍検体を対象とした。FFPE検体からDNAを抽出し、160遺伝子を対象とするパネルによる次世代シーケンス解析を行った。病理医によりHE染色標本を用いて組織型、グレード、サブタイプのアノテーションを行い、遺伝子変異の頻度を比較した。解析対象は321検体(IDC 246例、DCIS 75例)で、Low/intermediate gradeはIDCで89.8%、DCISで80.0%を占めた。DCISで頻度が高かった遺伝子変異はPIK3CA (22.7%)、AKT1 (17.3%)、GATA3 (14.7%)であり、IDCではPIK3CA (24.4%)、TP53 (14.6%)、MAP3K1 (10.6%)であった。変異を1例でも認めた117遺伝子について、Benjamini-Hochberg法による多重比較補正(FDR)を行った結果、統計学的に有意差のある遺伝子($p_{adj} < 0.05$)は認めなかったが、特にTP53変異は、IDCのHigh grade腫瘍で68.0%に対し、DCISでは0.6%と頻度に数値上の差を認めた。これらの結果から、TP53をはじめとする一部の遺伝子変異は、組織型やグレードによって変異頻度が異なる可能性も考えられた一方、DCISとIDCは遺伝子変異頻度に重複も認められること、また既報においても両者の間にはクローン連続性があり、IDCに進行する際のdriver mutationの獲得は少ないとする報告もあり、さらなる症例数の蓄積が必要と考えられた。

また、DCISの免疫組織化学染色を確認したところ、異型の少ないLuminal A typeから、比較的

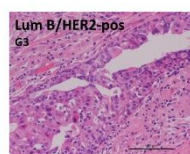
異型の強い HER2 および Triple negative type など、形態学的には非常に多彩な所見を認めた。



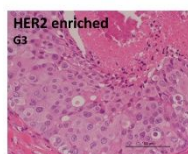
拡張した乳管内に、円形腫大核を有する小型～中型異型細胞が充実性、篩状構造を示し増生している。



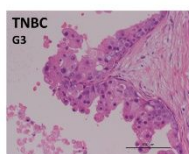
拡張した乳管内に、円形腫大核を有する小型～中型異型細胞が篩状構造を示し増生している。



拡張した乳管内に、円形腫大核を有する中型～大型異型細胞が乳頭状、篩状構造を示し増生している。



拡張した乳管内に、明瞭な核小体と好酸性細胞質を有する大型異型細胞が充実性、面瘤状に増生している。面瘤状壊死部に石灰化を伴う。



葉状に拡張した乳管内に、明瞭な核小体と好酸性細胞質を有する大型異型細胞が低乳頭状、ローマンブリッジ状の標識構造を示し増生している。

(2) *In vitro*での DCIS モデルを用いた CRISPR/Cas9 knockout screening

本研究では、DCIS の進展に関与する主要な遺伝子を網羅的に探索するため、MCF10DCIS 細胞株を用いた全ゲノム CRISPR/Cas9 KO スクリーニングを実施した。使用した Brunello ライブラリーは、約 19,000 のヒト遺伝子を対象とし、1 遺伝子あたり平均 4 本、計 76,000 本以上の sgRNA を含む構成であった。レンチウイルスを用いて MCF10DCIS 細胞にライブラリーを導入し、ハイグロマイシン選択後、感染細胞の一部をコントロール群として、残りを 7 倍化させたのち実験群として収集した。両群から抽出したゲノム DNA より sgRNA 配列を増幅し、次世代シーケンサーで解析した。その結果、2 つの生物学的複製において一貫して濃縮された 20 の候補遺伝子が同定された。これら候補遺伝子の中から、DCIS の増殖抑制に関与する可能性が高い 10 遺伝子を選出し、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。MCF10DCIS 細胞および Cas9- MCF10DCIS 細胞株においてノックダウン効率を確認した後、自然増殖条件下での細胞増殖を測定した。その結果、TAS2R および NPAS3 のノックダウンにより細胞増殖が有意に促進され、特に TAS2R では両細胞株で一貫した増殖促進効果が観察された ($p < 0.0001 \sim 0.01$)。本研究により、TAS2R の発現低下が DCIS 細胞の増殖性および進行性に寄与する可能性が示唆され、将来的に新規治療標的となる可能性がある遺伝子群を明らかにする成果を得た。

(3) DCIS のオルガノイドモデルの確立および *in vivo* モデルでの検証

本研究では、乳癌の手術検体を用いたオルガノイドの樹立・培養を試みた。DCIS は腫瘍非形成であることも多く、検体の macro-dissection および採取・培養が困難であることが予想されたため、まずは浸潤癌および正常乳管上皮からオルガノイド樹立を試みた。複数の subtype および多数のクローン樹立は成功したが、検体採取に適した症例が限られることから DCIS のオルガノイド樹立には至らなかった。また、MCF10DCIS の細胞株において TAS2R の KO モデルの作成を行ったため、マウスを用いた xenograft model での実験は現在準備を行っている。

今後は、DCIS 増殖の責任遺伝子と考えられる TAS2R について、増殖メカニズム解明のための機能解析、*in vivo*での検証を予定する。

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 永山愛子、林田 哲、藏本 純子、関 朋子、高橋 麻衣子、北川 雄光
2. 発表標題 免疫組織化学染色評価によるDuctal carcinoma in situ症例の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第124回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2024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
研究分担者	永山 愛子 (NAGAYAMA Aiko) (00573396)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	
研究分担者	林田 哲 (HAYASHIDA Tetsu) (80327543)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	

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
---------	---------