

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00542

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いた癌関連融合遺伝子の生成・生成抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of cancer-related gene fusion using CRISPR/Cas9

研究代表者

山内 基弘 (YAMAUCHI, Motohiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60437910

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)：本研究では、様々な癌、白血病、リンパ腫で見つかっている融合遺伝子を CRISPR/Cas9 システムにより人為的に生成し、その生成頻度を定量するアッセイを樹立することにより、融合遺伝子の生成・生成抑制に関わる因子を同定することが目的であった。研究成果としてはまず、肺癌などでみられる EML4-ALK 融合遺伝子の生成頻度をデジタル PCR で定量するアッセイの樹立に成功した。次にこのアッセイを用いて、主要な DSB 修復因子である DNA-PKcs が融合遺伝子の生成に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to establish a quantitative assay for the frequency of cancer-related fusion gene generated by CRISPR/Cas9, and to identify factors affecting gene fusion frequency. Our achievement is (1) establishment of an assay that quantifies the frequency of lung cancer-related EML4-ALK fusion gene by digital PCR, and (2) identification of DNA-PKcs protein as an important factor for the gene fusion.

研究分野：放射線生物学

キーワード：融合遺伝子 癌 CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

転座や逆位などの染色体再構成によって生じた融合遺伝子は、様々な造血器腫瘍や固形腫瘍で計 350 例以上見つかっており、全ての癌のうち、約 20%の癌の原因になっていると推計されている (Mitelman et al. *Nat. Rev. Cancer* 2007)。癌で見つかる遺伝子融合の多くは、細胞増殖に関与する遺伝子に起こっている。これらの遺伝子から発現する蛋白質は、基本的に増殖シグナルが伝達された時のみ活性化して細胞増殖を促進するが、遺伝子融合により融合蛋白質になると恒常的に活性化し、細胞の無秩序な増殖の一因となる。融合遺伝子は染色体再構成、すなわち複数の DNA 二本鎖切断 (DSB) のつながりかわりによってできる。DSB を誘発する外的要因としては放射線やある種の化学物質など、内的要因としては活性酸素種などが挙げられる。申請者はこれまで、放射線照射後の染色体転座の形成・形成抑制のメカニズムについて研究を行ってきており、ATM 蛋白質が p53 蛋白質および DNA-PKcs 蛋白質と協調して転座頻度を抑制していることを明らかにした (Yamauchi et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011)。また転座形成の際には、2本の染色体上の DSB 同士が動いて近接する必要があるが、その過程を Ku80 蛋白質が抑制し、53BP1 蛋白質が促進していることを明らかにした。今後は染色体レベルで見える転座だけではなく、癌で見ついている融合遺伝子の生成・生成抑制メカニズムを解明したいと考えている。そのためには人為的に融合遺伝子を生成させ、その頻度を定量できるアッセイが必要となる。しかし放射線はゲノム中にほぼランダムに DSB を生成するため、放射線を用いて再現性良く融合遺伝子を生成させるアッセイを樹立することは極めて困難である。再現性良く融合遺伝子を生成させるためには、融合させたい遺伝子の特定部位に DSB を導入する技術が必要となる。最近、ゲノム中の任意の部位に DSB を導入することが可能な ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 などの、いわゆる「ゲノム編集技術」が開発された。特に CRISPR/Cas9 はその圧倒的な手軽さから急速に普及しつつある。そこで私はこの CRISPR/Cas9 を用いれば、癌で見られる融合遺伝子を生成させる実験系を樹立可能であると考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術の中でも最も簡便な CRISPR/Cas9 を用いて癌関連融合遺伝子をヒト培養細胞に生成させ、その生成頻度を簡便に定量するアッセイを樹立する。そしてこのアッセイを用いて、癌関連融合遺伝子の生成・生成抑制にかかわる分子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

<CRISPR/Cas9 ベクターのデザインと構築>  
本研究では、CRISPR/Cas9 ベクターとして、ガイド RNA と Cas9 スクレアーゼの両方を同時に発現するレンチウイルスベクター lentiCRISPR v2 を用いた (マサチューセッツ工科大学の Feng Zhang 博士より譲受)。このベクターに、切断したい塩基配列を含む約 20 塩基対のオリゴ二本鎖 DNA を連結し、目的の部位に DSB を導入可能な CRISPR/Cas9 ベクターを構築した。DSB を導入する DNA 配列を決める際には、3'側に Cas9 切断配列である PAM 配列が存在し、かつ癌で見ついている遺伝子融合部位になるべく近いものを選択した。DSB 導入部位を決めたら、その部位を含む約 20 塩基のオリゴ一本鎖 DNA (センス鎖およびアンチセンス鎖) を合成した。合成されたセンス鎖およびアンチセンス鎖のオリゴ一本鎖 DNA は、アニーリングして二本鎖にした後、制限酵素 *BsmBI* で切断した lentiCRISPR v2 ベクターに連結し、ベクターを完成させた。

<細胞培養およびベクターの導入>

細胞はヒト肺がん細胞株 A549 を用い、20%FBS を添加した  $\alpha$ -MEM で培養した。ベクターの細胞への導入には Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific) を用いた。

<ゲノム DNA の抽出>

ベクター導入 24 時間後にゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA の抽出には、NucleoSpin Tissue キット (マッハライ・ナーゲル) を用いた。抽出した DNA は Nanodrop にて定量し、TE buffer を加えて 400 ng/ $\mu$ l に調製した。

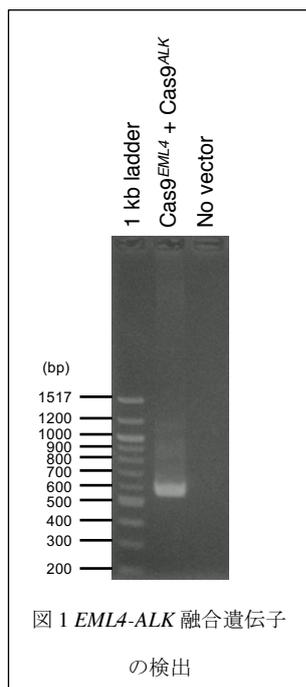
<融合遺伝子生成頻度の定量>

融合遺伝子の定量は、融合部位をはさむプライマーを用いたデジタル PCR により行った。デジタル PCR には QX200 Droplet Digital PCR system (Biorad) を用いた。200 ng のゲノム DNA をプライマー、制限酵素 *Hind III*、2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Biorad)、Nuclease-free water と混ぜ、Droplet Generator でドロップレットを生成させた。その後、ドロップレットに PCR を行い、EvaGreen 陽性 (=融合遺伝子陽性) のドロップレットの数を Droplet Reader にて定量した。

## 4. 研究成果

当初の計画では *ETV6-NTRK3* 融合遺伝子および *RET-PTC1* 融合遺伝子を生成する予定であったが、複数の CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、細胞に導入したものの、融合遺伝子生成を確認できなかった。一方、肺癌や乳癌、大腸癌で見ついている *EML4-ALK* 融合遺伝子を生成させるため、*EML4* 遺伝子および *ALK* 遺伝子を切断する CRISPR ベクターを構築し、ヒト肺がん細胞株 A549 に導入したところ、

再現性よく融合遺伝子を検出することができた (図1)。



そこで*EML4-ALK*融合遺伝子生成系を用いて「融合遺伝子生成頻度定量アッセイ」の樹立を目指すこととした。

本研究では、当初は融合遺伝子生成頻度の定量にリアルタイムPCRを用いる予定であったが、デジタルPCRへ変更することとした。理由は、デジタルPCRは絶対定量法であるため、リアルタイムPCRのように検量線作成のための希釈系列を作る必要がなく、用意するサンプル数を大幅に削減でき、しかも操作が非常に簡便で、短時間に定量できるためである。*EML4*遺伝子および*ALK*遺伝子を切断するCRISPRベクターをA549細胞に導入し、24時間後にゲノムDNAを抽出し、用いるゲノムDNA量を変えてデジタルPCRを行ったところ、融合遺伝子生成量はゲノムDNA量に比例して増加するという結果が得られた (図2)。

以上の結果から、CRISPR/Cas9システムによる*EML4-ALK*融合遺伝子の生成頻度の定量はデジタルPCRで行うこととした。樹立した融合遺伝子生成頻度の定量アッセイを用いて、融合遺伝子の生成・生成抑制にかかわる因子の探索を行った。主要なDNA修復因子である、DNA-PKcs, Ligase IV, あるいはPARP1に対する阻害剤を細胞に処理したところ、DNA-PKcsの阻害剤を処理した細胞でのみ、*EML4-ALK*融合遺伝子の生成量がコントロールと比べ有意に減少することがわかった (図3)。この結果はDNA-PKcsが*EML4-ALK*融合遺伝子の生成において重要な役割を担っていることを示唆している。

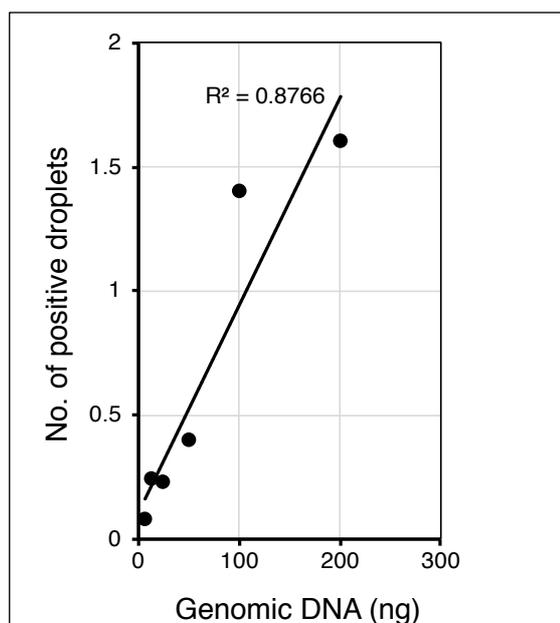


図2 PCRに用いるゲノムDNAの量とEvaGreen陽性 (=融合遺伝子陽性) ドロップレットの頻度の関係。

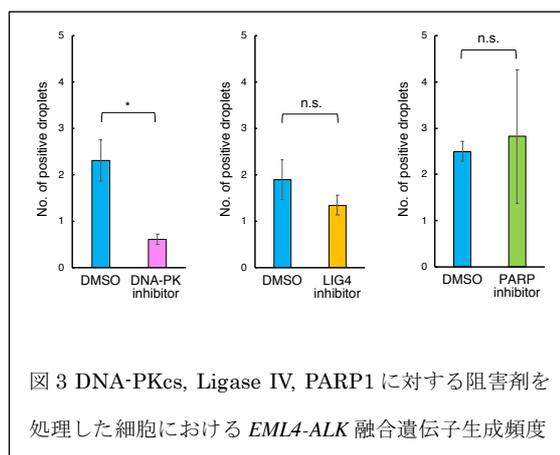


図3 DNA-PKcs, Ligase IV, PARP1に対する阻害剤を処理した細胞における*EML4-ALK*融合遺伝子生成頻度

DNA-PKcsはDSB修復経路のひとつ、Classical non-homologous end joining (c-NHEJ)の主要な因子であるため、c-NHEJおよび最近見つかったc-NHEJのサブ経路にかかわる因子群を中心に現在RNAiスクリーニングを実施中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Yamauchi M, Shibata A, Suzuki K, Suzuki M, Niimi A, Kondo H, Miura M, Hirakawa M, Tsujita K, Yamashita S, Matsuda N. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. *Sci Rep* 7:41812 | DOI: 10.1038/srep41812, 2017 査読有り

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 山内基弘 CRISPR/Cas9 を用いた癌関連融合遺伝子の生成頻度の定量アッセイの樹立 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年
2. 山内基弘、平川美弥子、辻田啓子、松田尚樹 Establishment of a novel quantitative assay for cancer-related gene fusion using CRISPR/Cas9. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山内 基弘 (YAMAUCHI, Motohiro)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所  
助教

研究者番号：60437910

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし