

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15024

研究課題名(和文)腫瘍形成に求められるゲノム多様性の検証

研究課題名(英文)Verification of genomic diversity required for tumorigenesis

研究代表者

中山 啓子(NAKAYAMA, KEIKO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60294972

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):がんゲノムの解析によって、固形腫瘍を構成している細胞は様々な細胞が共生していることが知られるようになった。本研究ではがんはどのような細胞によって構成されているかを探索した。CRISPR/Cas9ライブラリーによってゲノムに多様な変異を導入した細胞から抽出したゲノムDNAのシーケンシングを行い、ライブラリーDNAと比較した。その結果、細胞のゲノムDNAライブラリーの多様性は、導入ライブラリーより低下していることが判明した。in vitroで細胞死が誘導や、細胞増殖が抑制されるクローンが存在し、そのような細胞は、他の細胞に比しin vitroでの生存が不利であることを表していると考えている。

研究成果の概要(英文):It has been demonstrated that solid tumors are composed of various genomic mutated cells by genomic sequencing and analysis of diversity. In this program, we tried to identify critical mutations to generate solid tumors by random mutagenesis using CRISPR/Cas9 library. We used library which randomly made deletions at promoter regions of almost all reported human genes. We infected CRISPR/Cas9 library to human cancer cell lines to generate randomly mutated cell pool. Diversity of library extracted cell line were reduced within several days culture after introduction of library compared to that of original library. This observation suggest that in introduction of library make some clones die or proliferate less, as these clones have disadvantage to survival in vitro compared to other clones.

研究分野：総合生物

キーワード：腫瘍形成 CRISPR/Cas9 次世代シーケンサー 乳癌細胞株 免疫不全マウス

1. 研究開始当初の背景

血液系細胞の研究から「がん幹細胞」の存在が示唆され、その単離が試みられている。しかし、必ずしも全ての癌で単離できているわけではない。一方、次世代シーケンサーの活用によって大量の DNA シーケンスが可能となった。悪性腫瘍では、遺伝子の変異や転座・重複などゲノムの変化が認められることは古くから知られているところであり、癌ゲノムのシーケンスは、がんの成立過程を知る上で重要な情報を提供すると期待されている。2014年には、がんを構成する単一細胞のゲノムシーケンスが報告され、一つの固形腫瘍であっても非常に多様な細胞から構成されていることが示された。がんは、増殖能が高い細胞や、細胞死に対して抵抗性である細胞のみが選択的に選ばれてクローナルな腫瘍を形成していると考えられ、理解しやすい。しかし、決してそのような単純な機構で腫瘍が成り立っているのではないことが示されたことになる。実際、様々な細胞形質を付与した細胞群を混合して腫瘍形成を試みると個体内では、試験管内で認められる増殖能や細胞死への抵抗性だけでは説明できないさまざまな細胞群が混成して腫瘍を形成することが知られている。

そこで、腫瘍の維持や転移における細胞群の性質を明らかにすることが腫瘍形成を理解する上で必要であると考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究課題では、形成された腫瘍の性質を探索するというアプローチではなく、最近実用化された CRISPR/Cas9 システムと、超並列ゲノム解析を活用して、多様な細胞を混合して腫瘍形成を誘導し、誘導された腫瘍を調べることで、腫瘍の維持や転移に貢献する細胞群を調べ上げ、腫瘍という細胞社会の構成員を明らかにすることを目的とした。

CRISPR/Cas9 システムを利用して様々な細胞株で網羅的な遺伝子破壊を行う。それらの細胞を用いて免疫不全マウス内で腫瘍形成を誘導し、腫瘍形成後に次世代シーク

エンサーでゲノムを解析することで、腫瘍を構成する細胞群の中に見られる遺伝子変異とそのような変異を持つ細胞の頻度情報の一覧を作成する。そして、様々な変異を持つ細胞群を再構成し腫瘍形成を誘導することで、その一覧の有意性の検証も行う。

3. 研究の方法

すでに配布が開始されている「Mouse GeCKO v2 Library, 1 plasmid system」(addgene)を用いて、マウス細胞株に変異の導入を行う。最初に、モデル細胞として NIH3T3 細胞を用いる予定である。NIH3T3 細胞は、細胞培養では無限に増殖が可能であるが、免疫不全マウスに移植しても腫瘍が形成されないことが知られている。そこで上記ライブラリーを導入し、様々な遺伝子変異が導入されている細胞集団を作成する。また腫瘍形成能が比較的低い事が確認されている乳がん細胞株 MDA-MD-468 についても検討を行った。

Guide RNA 発現ベクターには Puromycin 耐性遺伝子が挿入されているので、Puromycin によって選択することで Guide RNA が発現している細胞群が得られる。これらからゲノム DNA を回収し、ライブラリーの導入効率やライブラリーの多様性が維持できているかを、次世代シーケンサーを用いた解析で決定する。さらに培養を継続することによる細胞の多様性の変化を継続的にゲノム DNA を回収しシーケンスすることで解析した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 ライブラリーを NIH3T3 細胞と MDA-MD-468 細胞株への導入を試みた。導入した細胞から抽出したゲノム DNA から、ライブラリーに付加されているアダプター配列に相補的なプライマーを用いて、ライブラリー DNA を回収した。このゲノムより回収されたライブラリーと、オリジナルライブラリーについて次世代シーケンサーを用いて大規模並列型にシーケンスを決定した。その結果を解析し、オリジナルライ

ブラリーと導入細胞より抽出されたゲノム DNA より回収されたライブラリーを構成するクローンの種類と頻度を比較検討した。その結果、細胞から抽出されたゲノム DNA で見られるライブラリーの多様性は、導入ライブラリーより低下していることが判明した。このことはライブラリー導入によって *in vitro* での細胞死が誘導されたり、細胞増殖が抑制されたクローンが存在することを示唆するものである。実際、他の細胞に比し *in vitro* での生存が不利であると予想されるアポトーシス抑制タンパク質を欠失させるようなクローンはライブラリー導入細胞には見られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Matsumoto, M., Kondo, K., Shiraki, T., Brydun, A., Funayama, R., Nakayama, K., Yaegashi, N., Katagiri, H. & Igarashi, K. Genomewide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. *Genes Cells* (in press)(2016)doi: 10.1111/gtc.12365. 査読有

Higasa, K., Miyake, N., Yoshimura, J., Okamura, K., Niihori, T., Saito, H., Doi, K., Shimizu, M., Nakabayashi, K., Aoki, Y., Tsurusaki, Y., Morishita, S., Kawaguchi, T., Migita, O., Nakayama, K., Nakashima, M., Mitsui, J., Narahara, M., Hayashi, K., Funayama, R., Yamaguchi, D., Ishiura, H., Ko, W.Y., Hata, K., Nagashima, T., Yamada, R., Matsubara, Y., Umezawa, A., Tsuji, S., Matsumoto, N. & Matsuda, F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet* (in press)(2016) doi: 10.1038/jhg.2016.12. 査読有

Niihori, T., Ouchi-Uchiyama, M.,

Sasahara, Y., Kaneko, T., Hashii, Y., Irie, M., Sato, A., Saito-Nanjo, Y., Funayama, R., Nagashima, T., Inoue, S., Nakayama, K., Ozono, K., Kure, S., Matsubara, Y., Imaizumi, M. & Aoki, Y. Mutations in MECOM, Encoding Oncoprotein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 97, 848-854(2015)doi:10.1016/j.ajhg.2015.10.010. 査読有

Izumi, R., Warita, H., Niihori, T., Takahashi, T., Tateyama, M., Suzuki, N., Nishiyama, A., Shirota, M., Funayama, R., Nakayama, K., Mitsuhashi, S., Nishino, I., Aoki, Y. & Aoki, M. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked hnRNPA1 mutation. *Neurol Genet* 24, e23(2015) doi: 10.1212/NXG.000000000000023. 査読有

Hino-Fukuyo, N., Kikuchi, A., Arai-Ichinoi, N., Niihori, T., Sato, R., Suzuki, T., Kudo, H., Sato, Y., Nakayama, T., Kakisaka, Y., Kubota, Y., Kobayashi, T., Funayama, R., Nakayama, K., Uematsu, M., Aoki, Y., Haginoya, K. & Kure, S. Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. *Hum Genet* 134, 649-658(2015)doi:10.1007/s00439-015-1553-6. 査読有

Fujiwara, I., Murakami, Y., Niihori, T., Kanno, J., Hakoda, A., Sakamoto, O., Okamoto, N., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K., Kinoshita, T., Kure, S., Matsubara, Y. & Aoki, Y. Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A*. 167A, 777-785 (2015) doi:

10.1002/ajmg.a.36987. 査読有

Nakagawa, T. & Nakayama, K. Protein monoubiquitylation: targets and diverse functions. *Genes cells* 20,543-562(2015)doi:10.1111/gtc.12250. 査読有

Kojima, T., Yamada, T., Akaishi, R., Furuta, I., Saitoh, T., Nakabayashi, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Akira, S. & Minakami, H. Role of the Atg9a gene in intrauterine growth and survival of fetal mice. *Reprod Biol* 15,131-138(2015)doi:10.1016/j.repbio.2015.05.001. 査読有

Wong, W.F., Kohu, K., Nagashima, T., Funayama, R., Matsumoto, M., Movahed, E., Tan, G.M., Yeow, T.C., Looi, C.Y., Kurokawa, M., Osato, M., Igarashi, K., Nakayama, K. & Satake, M. The artificial loss of Runx1 reduces the expression of quiescence-associated transcription factors in CD4(+) T lymphocytes. *Mol Immunol* 68, 223-233 (2015)doi:10.1016/j.molimm.2015.08.012, 査読有

Ellawindy, A., Satoh, K., Sunamura, S., Kikuchi, N., Suzuki, K., Minami, T., Ikeda, S., Tanaka, S., Shimizu, T., Enkhjargal, B., Miyata, S., Taguchi, Y., Handoh, T., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Nakayama, K., Miura, M. & Shimokawa, H. Rho-Kinase Inhibition During Early Cardiac Development Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 2172-2184(2015)doi:10.1161/ATVBAHA.115.305872. 査読有

Nakagawa, T., Araki, T., Nakagawa, M., Hirao, A., Unno, M. & Nakayama, K. S6

Kinase- and beta-TrCP2-Dependent Degradation of p19Arf Is Required for Cell Proliferation. *Mol Cell Biol* 35, 3517-3527(2015)doi:10.1128/MCB.00343-15. 査読有

[学会発表](計3件)

舟山亮、細金正樹、長嶋剛史、中山啓子. がん原遺伝子 RAS による遺伝子サイレンシングの分子機構の解析 第 38 回日本分子生物学会年会 2015/12/1 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

諸星茜、中川直、中野星児、中山啓子. セルトリ細胞特異的 -TrCP ノックアウトマウスの解析 第 38 回日本分子生物学会年会 2015/12/1 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

中川直、細金正樹、舟山亮、中山啓子. TGF-刺激による TFIID 構成因子 TAF7 の分解とその役割の解明 第 38 回日本分子生物学会年会 2015/12/4 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

がん医学コアセンター細胞増殖制御分野
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 啓子 (NAKAYAMA, KEIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60294972

(2) 研究分担者

舟山 亮 (FUNAYAMA, RYO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20452295

中川 直 (NAKAGAWA, TADASHI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30707013

細金 正樹(HOSOGANE, MASAKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：30734347