

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：85402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15497

研究課題名(和文) CRISPR/CAS9 ゲノム編集システムを使った新規大腸癌動物モデルの作製

研究課題名(英文) Establishment of new colon cancer animal model using CRISPR / CAS 9 genome editing system

研究代表者

檜井 孝夫 (Hinoi, Takao)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・臨床研究部室長

研究者番号：10444689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規ゲノム編集システム(CRISPR/CAS9)を使って(1)大腸上皮特異的Apcノックアウトマウス(CPC-APCマウス)に大腸腫瘍で特異的な転写活性をもつレポーター遺伝子を組み込んでリアルタイムで腫瘍サイズの測定が可能なマウスの作製、ならびに(2)CPC-APCマウスと同じ遺伝子変異を持つ大腸上皮特異的Apcノックアウトラットを作製し、治療効果判定が容易な動物モデルの作製をめざした。CPC-APCマウスで利用したCDX2プロモーター配列(9.5kb)の組み込みが困難であり、同時にラットでの遺伝子改変のためのモデルが十分に確立できずこれらのモデルの作製に難渋した。

研究成果の概要(英文)：Using a novel genome editing system (CRISPR/CAS9), we tried to generate (1) new mouse model in which tumor size can be measured in real time by incorporating a reporter gene having specific transcriptional activity in colon tumor into colon epithelium-specific Apc knockout mouse (CPC-APC mouse), and (2) colon epithelium-specific Apc knockout rats model having the same gene mutation as CPC-APC mice, which is aimed to prepare an new animal model that is easy to judge therapeutic effect. However, it was difficult to integrate the CDX2 promoter sequence (9.5 kb) used in CPC-APC mouse, and at the same time, models for genetic modification in rats could not be established sufficiently, making it difficult to prepare these models.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 動物モデル CRISPR / CAS 9 genome editing system

1. 研究開始当初の背景

癌の浸潤・転移の研究には免疫系や微小環境の影響を検討できる動物モデルが必須であるが、大腸癌において私共はCPC-APC マウスが自然発生の浸潤癌モデルを確立し、それを応用して高度浸潤癌や粘液癌のモデルが作製されつつある。マウス腫瘍は細径内視鏡で観察できるが、定量性に乏しい。また分子標的薬(抗体薬)ではマウスの腫瘍に対して反応しないため、マウスモデルは使いにくいという問題点があった。遺伝子改変に使われる Cre-loxP システムは、マウス以外の動物種に応用が困難である。近年、ゲノム編集技術が飛躍的に進歩し、2014年に報告されたCRISPR/CAS9系ではDNA 2重鎖切断(ノックアウト)とターゲティングベクターによる変異挿入(ノックイン)が簡便にできるようになった。また遺伝子組み換えを導入する際、ES細胞を必要としないためラットなど他種の動物疾患モデルの作製を容易とした。

2. 研究の目的

本研究では、新規ゲノム編集システムであるCRISPR-CAS9システムを応用して以下の研究を目的として行った。

(1) in vivo イメージが可能なCPC-APCモデルの作製: in vivo イメージが可能なCPC-APCマウスは、リアルタイムで屠殺せずに腫瘍の発生や増大、浸潤、転移そして投与した薬剤の効果などが観察可能となる。CPC-APCマウスに大腸腫瘍で特異的な転写活性を持つTOP/FOP Flash-luciferase(GFP)を組み込んだレポーター遺伝子マウスを作製し、リアルタイムで腫瘍サイズの測定が可能なマウスの作製をめざす。in vivo イメージが可能なCPC-APCマウスは、リアルタイムで屠殺せずに腫瘍の発生や増大、浸潤、転移そして投与した薬剤の効果などが観察可能となる。

(2) 新規ラット大腸癌モデルの作製: ラット大腸浸潤癌マウスモデルは、(1)外科的操作がマウスに比べると容易で、実臨床での様々な問題

点をヒトの発癌形式に酷似した動物モデルで検証することができる。(2)実臨床で使用されている分子標的薬(とくに抗体薬)や免疫作動薬の効果判定がラットモデルでは可能となる。複数の抗体薬を同時に投与して相乗効果を判定できる。ヒトでの個別化医療の研究を動物モデルによって模倣することが可能となり、動物モデルでのデータの蓄積により、臨床研究期間を大幅に短縮することが可能となり、大腸癌抗癌剤領域での研究が加速する。CRISPR-CAS9は他の動物種においてもゲノム編集が可能であり、CPC-APCマウスと同じ遺伝子変異を持つラットを作製し大腸上皮特異的Apcノックアウトを行い、ヒトで使う抗体薬の効果判定が可能な動物モデルの作製を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、CRISPR/Cas9システムを応用するため、それに必要なCas9の発現ベクターや配列特異性のガイドRNA発現ベクターが必要となる。これらの提供を受け私共が持つマウス大腸癌モデルに使用したトランスジーン(組み込まれた遺伝子)の配列をもとにガイドRNA発現ベクターを遺伝子組み換え実験で作製する。

(1) in vivo イメージマウスモデルでは、CPC-APCおよびCDX2PpolyG Cre-APCマウスの受精卵に遺伝子導入してGRPやluciferaseのcDNAをレポーター遺伝子としてマウスゲノム内に組み込む。(2)ラット大腸癌モデルの作製については、まずCDX2のプロモーター領域9.5kbが大腸上皮特異的な転写活性をもつかどうかを確認する。つぎに、このフラグメントの下流にCre recombinaseを結合した遺伝子改変ラットを作製する。Apc遺伝子に特異的なガイドRNAをデザインし、それをラットの受精卵にmicroinjectionする。

(1) In vivo イメージマウスモデルでは、CRISPRのターゲットのデザインについては、CRISPR/Cas9システムでは遺伝子配列に特異的にDNA double-strand break (DSB)が誘導

される。それに必要な遺伝子配列をマウスゲノムから選択する。NGG(PAM)シークエンスで終わる 20 塩基の配列となる。次に two-cut strategy に必要なベクターの作製を計画した。GFP や Cre のマウスやラットへの組み込みについては、既にプロトコルが報告されており、それを用いて GFP, luciferase, Cre recombinase の cDNA を含み、遺伝子導入部位に homology arm をもつ環状のベクターを遺伝子組み換え実験によって作製する。私共はすでに 9.5kb の CDX2 promoter をトランスジーン用のベクターに数回の組換えを行い挿入する技術を持っているので作製が可能と思われる。このようにしてできた CRISPR/Cas9 ベクターを打ち込みマウスの作製(one-cell stage の胚細胞を分離してベクターをマイクロインジェクションし、マウスを作製する。

(2) 新規ラット大腸癌モデルの作製には、CRISPR のターゲットのデザインを行った。本モデルの場合、まずヒト CDX2 プロモーターを遺伝子導入してラットの大腸上皮細胞で特異的な転写活性を持つ事を確認し、CDX2 プロモーターの下流に Cre 蛋白質(単独) Cre-ERT2 (タモキシフェン発現誘導型) polyG-Cre (マイクロサテライト発現誘導型)などを組み込んだトランスジーンをラットに相同組換えできるような Off-target 配列をデザインした。次に two-cut strategy に必要なベクターの作製し、CRISPR/Cas9 ベクターの打ち込みによるマウスの作製を行う。

4. 研究成果

(1) In vivo イメージでリアルタイムに評価可能なマウス大腸癌モデルの作製
CRISPR/Cas9 システムでは遺伝子配列に特異的に DNA double-strand break (DSB)が誘導される。それに必要な遺伝子配列をマウスゲノムから選択する。GFP や Cre のマウスやラットへの組み込みについては、既存のプロトコルを参考として行った。それを用いて GFP,

luciferase, Cre recombinase の cDNA を含み、遺伝子導入部位に homology arm をもつ環状のベクターを遺伝子組み換え実験によって作製を試みた。私共はすでに 9.5kb の CDX2 promoter をトランスジーン用のベクターに数回の組換えを行っていたので、コンストラクトの作製を試みたが、各フラグメントのクローニング、遺伝子組み換え実験は時間を要し、培養細胞株を用いたコントロール実験で目的とするフラグメントの機能が十分に検証できず、タンパク質としての発現も十分ではなかった。

(2) 新規ラット大腸癌モデルの作製についての研究も、上記の(1)でのコンストラクトの機能が十分に確認できず、また遺伝子改変動物としてラットの ES 細胞ならびに遺伝子改変実験がうまくワークしなかったことから、モデルの作製に至らなかった。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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

檜井孝夫 (HINOI, Takao)

独立行政法人国立病院機構

(呉医療センター臨床研究部)

・その他部局等・臨床研究部室長

研究者番号: 10444689

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

斉藤保文 (SAITO, Yasufumi)

三口真司 (Miguchi Masashi)