

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20203

研究課題名(和文) CRISPR/Casを用いた頭頸部癌のゲノム改変と発癌モデルの開発

研究課題名(英文) Genome editing and cancer modeling for head and neck cancer using CRISPR/Cas system

研究代表者

チョウ 弘規 (Cho, Hironori)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40648812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Casシステムを用いて、頭頸部扁平上皮癌細胞のゲノム改変を行い、発癌過程における遺伝子異常の役割を解明することを目的とした。ノックアウト細胞についてはDet562、Fadu、UMSCC47の3種類の細胞で樹立し、ターゲット部位特異的gRNAとCas9を共導入することによって行った。標的遺伝子はP53、PIK3CAとE6、E7であり、シークエンスによって破壊を確認した。ノックイン細胞はP53については作製できたが、PIK3CAでは作製できなかった。CRISPR/Casは頭頸部扁平上皮癌細胞株のゲノム編集に適しており、上記遺伝子は発癌過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of gene mutation in oncogenic process using the genome editing CRISPR/Cas system of head and neck squamous cell carcinoma. We established the knock out cells of p53 and PIK3CA gene at HNSCC cell lines, Det562, Fadu and UMSCC47 using the CRISPR/Cas system. Moreover, at UMSCC47, HPV16 positive cell line, we also knocked out E6 and E7 genes which play the important role in oncogenic process. P53 gene knock in cell lines are made at Det562, but Established PIK3CA gene knock in cell lines was unsuccessful, because genome editing of PIK3CA gene leads the fatal damages on cell lines. These data indicated that CRISPR/Cas system is suitable for genome editing of HNSCC cell lines and p53, PIK3CA, E6 and E7 genes are important for oncogenic process.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：crispr/cas

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は飲酒・喫煙が発癌要因であることは広く知られており、これらに含まれる発癌物質が繰り返し粘膜に暴露されることで多くの遺伝子異常が引き起こされ、最終的に発癌すると考えられている。近年のテクノロジーの進化により各癌腫のゲノム解読が実行され、頭頸部癌は全癌腫の中で4番目に多く遺伝子異常が検出されている¹。2011年には頭頸部癌の本格的なゲノム解読の結果が相次いで報告された^{2,3}。両者で、共通して検出された頻度の高い遺伝子異常は *p53* (47%)、*NOTCH1* (15%)、*CDKN2A* (9%)などである。これらの遺伝子異常は発癌過程において発癌誘導的な役割を果たすとは推測されるが、*p53* ノックアウトマウスでは頭頸部癌が発生したという報告はなく、*p53* 単独というより複数の遺伝子異常の蓄積で頭頸部の発癌に至ると考えられる。

ゲノム編集とはゲノムの特定部位を切断できる人工制限酵素を用いて、任意のゲノム配列だけを削除・挿入・置換できる技術である。現代の医学生物学研究において、ノックアウト、ノックイン動物や細胞の作製は当然のように考えられているが、これまでのES細胞を用いた作成方法では自然発生による偶発的な相同組み換えを利用しているため効率が悪く、時間とコストがかかることが難点であった。2009年以降、ZFN (Zinc Finger Nuclease)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)といったゲノムの特定部位を切断する人工酵素の開発が相次いで報告され、ゲノム編集が比較的簡単にできるようになった。しかし、上記酵素はその作成自体がやや煩雑であるという欠点があり、その後開発されたCRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic

Repeats/CRISPR-associated)は、これまでのES細胞を使用した技術やZFN、TALENと比較しても変異の誘導効率性や労力・時間の面で非常に優位性があり、今後のゲノム編集の主力技術になると予想されている^{4,5}。

我々は、日本人の頭頸部癌検体からDNAを抽出し*p53*の遺伝子異常について詳細に検討したが、その中で変異を認める割合は飲酒・喫煙歴がある群で48%との結果であり、ほとんどが点変異であった⁶。そこで、本研究では*p53*を中心として、前述の*Science*誌に報告された遺伝子も加えて、遺伝子改変実験を行い、頭頸部癌における遺伝子異常の意義を解明することを着想した。

2. 研究の目的

「CRISPR/Cas」システムを用いて、頭頸部扁平上皮癌細胞のゲノム改変を行い、その発癌過程における遺伝子異常の役割を解明することを目的とする。また、正常頭頸部扁平上皮細胞を採取し、そのゲノムにCRISPR/Casを用いて既知の頭頸部癌遺伝子異常部位を導入することにより頭頸部の発癌モデルが作成可能かどうか検討することも目的とする。

3. 研究の方法

1. 頭頸部扁平上皮癌細胞株を基にして*p53*・*PIK3CA* ノックアウト細胞と、*p53*・*PIK3CA* を正常配列に置換したノックイン細胞を作成する。
具体的には数種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、*p53*の変異部位を削除したノックアウト細胞と、*p53*を正常配列に置換したノックイン細胞を作成し、それぞれを比較検討する。これらの細胞における標的配列の破壊・挿入は、PCRおよびDNAシーケンス

にて確認する。同様の手段にて PIK3CA についてもノックイン・ノックアウト細胞を作成する。

2. 上記で作成した細胞を用いて、細胞周期・細胞増殖能・腫瘍形成能に関する各種アッセイを行い、遺伝子変異を正常に戻すことで正常細胞に回帰するかどうか検討する。
3. 正常頭頸部扁平上皮を採取し、p53 や PIK3CA などの変異部位を導入した遺伝子改変細胞を作成したあと、マウス口腔粘膜下に移植して発癌するかどうか検討する。

4. 研究成果

ノックアウト細胞の樹立

頭頸部扁平上皮癌細胞株での CRISPR/Cas を用いたノックアウト・ノックイン細胞の作製を計画し、ノックアウト細胞については Det562, Fadu, UMSCC47 の3種類の細胞で樹立した。これらは当初の予定通り、ターゲット部位特異的 gRNA と Cas9 を共導入することによって行った。標的遺伝子として P53, PIK3CA についてノックアウトを行い、シークエンスによって破壊を確認した。表現型解析は増殖アッセイ・細胞周期アッセイを行い、目的の遺伝性が dysfunction することによる細胞挙動の変化を確認した。

UMSCC47 については、HPV16 陽性細胞株であり、このことから当初の遺伝子に加えて HPV 陽性細胞株における発癌遺伝子である E6, E7 もノックアウトすることに成功した。UMSCC47 においても上記と同様に増殖アッセイ・細胞周期アッセイによって標的遺伝子がノックアウトされていることを確認した。

ノックイン細胞の樹立

ノックインについては、PIK3CA が致死的な遺伝子であり、ノックアウト細胞をシングルセル化することが困難であった。Det562、Fadu において、P53 ノックアウト細胞についてノックイン細胞を作成し、表現型解析を行ったが、増殖アッセイ・細胞周期アッセイを行ったが、想定していた増殖能は得られなかった。このことは、挿入した p53 配列の部位のほかに頭頸部扁平上皮細胞癌株において複数の p53 機能的発現部位があり、1 部位のみのノックインでは細胞全体としては機能しないことが考えられた。

マウスへのゲノム編集細胞の導入

正常扁平上皮へのノックインは上記に記す通り、困難であった。Det562 における PIK3CA ノックアウト細胞と野生株をマウス口腔内に局注したが、いずれも生着しなかった。マウス背部皮下にこれらを局注したところ、野生株は生着し増殖をみたが、ノックアウト細胞は生着しなかった。このことは、invitro と同じくノックアウトが機能していることを示していると考えられた。

(引用文献)

1. Vogelstein B, et al. *Science* 2013
2. Agrawal N, et al. *Science* 2011,
3. Stransky N, et al. *Science* 2011
4. Xue W, et al. *Nature* 2014
5. Platt RJ, et al. *Cell* 2014
6. Maruyama H, et al. *Cancer Sci* 2014

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

曹 弘規 (CHO Hironori)

大阪大学医学部附属病院 医員

研究者番号：40648812

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()