

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14664

研究課題名(和文) DNA複製による転写とエピゲノム状態の制御の可能性について

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・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)：NIH3T3細胞とMDA-MD-468細胞株にCRISPR/Cas9ライブラリーを導入し、遺伝子ノックアウト細胞群を得た。これらの細胞を、免疫不全マウスの背部皮下に接種し、腫瘍形成を試みた。野生型のNIH3T3細胞は腫瘍形成が見られず、ライブラリー導入細胞を用いても安定した腫瘍形成を観察することができなかった。このことは、NIH3T3細胞では、単一の遺伝子破壊を行った細胞集団が存在しても腫瘍形成には至らないことを示唆している。同様の実験をMDA-MD-468細胞株を用いて行った結果、野生型の細胞に比べて、ライブラリー導入細胞は、腫瘍形成が促進していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：CRISPR/Cas9 library was introduced to NIH3T3 cells and MDA-MD-468 cells to generate cell library which are gene disrupted. Groups of cells which was disrupted a gene by CRISPR/Cas9 system were obtained. These cells were inoculated subcutaneously on the back of immunodeficient mice to grow tumors. Even NIH3T3 cells which were introduced library failed to stable tumorigenesis as well as wild type cells. These data suggested that NIH3T3 population containing different kinds of a single gene disrupted cells did not achieve capability of tumorigenesis. With MDA-MD-462 cells, we observed cells introduced CRISPR/Cas9 library gain function of tumorigenesis compared to wild-type cells.

研究分野：細胞増殖メカニズムやそれを修飾する分子に関わる研究

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Cas9システム 超並列シーケンス解析 腫瘍形成能

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。

そこで、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。

2. 研究の目的

(1) 明らかにしようとする内容

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ケ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リストを作成する。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、そのリストの有意性を検証する。

(2) 予想される結果と意義

がんが多様なゲノムを持つ細胞集団からなることが知られるようになったが、逆に、どのような多様性を持つことが必要とされるのかについては、未だ答えを得られていない。そこで、本研究課題では、網羅性を持って多様な細胞群を作製し、腫瘍形成や転移という *in vivo* で観察される指標を利用してスクリーニングを行う。腫瘍形

成には遺伝子変異が引き金となることは論を待たないが、腫瘍を維持さらに転移を誘導する遺伝子群を探索することで、新しい治療戦略の展開に繋がる可能性があり、大きな意義があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 導入効率の検証・細胞株の選択・細胞の多様性の検証

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。NIH3T3 に加え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、さらに白血病のモデルとして K562 細胞についても検討を行う。導入された細胞群からゲノム 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、解析する。

(2) 免疫不全マウスでの腫瘍形成：細胞の移植方法の検討

細胞を免疫不全マウスへ移植し、腫瘍形成を誘導する。移植方法及び腫瘍形成後に腫瘍細胞を回収する時期についても検討を行う。

(3) 超並列シーケンス解析による腫瘍を構成する細胞集団の決定

腫瘍・転移巣よりゲノム DNA を抽出する。CRISPR/Cas9 ライブラリーの要素である Guide RNA 発現ベクターのクローニングサイトの 3' 側及び 5' 側の配列に相補的なプライマーを用いて PCR を行い、細胞に組み込まれたライブラリー配列を増幅、次世代シーケンサーでゲノム配列情報を取得し、どのような細胞集団が腫瘍を構成しているかを検証する。

(4) 遺伝子変異導入細胞を用いた検証

リストアップされた遺伝子変異が腫瘍形成に関与することを検証する。遺伝子リストは、腫瘍内の細胞数の割合によって序列を付け、文献的調査を行い、これまでに機能的に腫瘍形成に関わることが示唆されるような遺伝子、腫瘍で高頻度に変異が認められている遺伝子に注目する。また、いくつかの細胞種において共通に認められたもの、培養中に見られず生体内での腫瘍形成で初めて貢献した遺伝子変異などを中心に検証実験を行う。

各遺伝子に変異を導入する guide RNA 発現ベクターを作製し、スクリーニング

に用いた CRISPR/Cas9 発現ベクターと共発現する。この細胞より抽出されたゲノム DNA の guide RNA 周囲の遺伝子配列を調べることで調べて、遺伝子変異が導入されていることを確認する。

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 での細胞死が誘導または、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。

次に、これらの細胞を、免疫不全マウスの背部皮下に接種し、腫瘍形成を試みた。野生型の NIH3T3 細胞は腫瘍形成が見られなかったが、ライブラリー導入細胞を用いても、安定した腫瘍形成を観察することができなかった。このことは、NIH3T3 細胞では、単一の遺伝子破壊を行った細胞集団が存在しても腫瘍形成には至らないことを示唆している。しかし、今回用いたライブラリーの多様性と遺伝子破壊効率が不十分であった可能性は否定できない。

続いて、MDA-MD-468 細胞株を用いて同様の実験を行った。MDA-MD-468 細胞株では、野生型の細胞に比べて、ライブラリー導入細胞は、腫瘍形成が促進していることが確認された。そこで、腫瘍を回収し、ゲノムを抽出、細胞に組み込まれたライブラリー配列を増幅、次世代シーケンサーでゲノム配列の読み取りを行っ

た。現在、その結果を解析しており、腫瘍特異的に増加している遺伝子破壊細胞を特定する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)すべて査読有
Hosogane, M., Bosu, L., Fukumoto, E., Yamada, H., Sato, S., Nakayama, K.: Geminin is an indispensable inhibitor of Cdt1 in mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 2017.

doi: 10.1111/gtc.12482. [Epub ahead of print]

Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., Ochiai, K., Muto, A., Igarashi, K.: A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep* 18, 2401-2414, 2017.

doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.029.

Matsumoto, M., Matsuzaki, F., Oshikawa, K., Goshima, N., Mori, M., Kawamura, Y., Ogawa, K., Fukuda, E., Nakatsumi, H., Natsume, T., Fukui, K., Horimoto, K., Nagashima, T., Funayama, R., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nat Methods* 14, 251-258, 2017. doi: 10.1038/nmeth.4116.

Sato, Y., Katoh, Y., Matsumoto, M., Sato, M., Ebina, M., Itoh-Nakadai, A., Funayama, R., Nakayama, K., Unno, M., Igarashi, K.: Regulatory signatures of liver regeneration distilled by integrative analysis of mRNA, histone methylation, and proteomics. *J Biol Chem* 2017.

doi: 10.1074/jbc.M116.774547. [Epub ahead of print]

Tode, N., Kikuchi, T., Sakakibara, T., Hirano, T., Inoue, A., Ohkouchi, S., Tamada, T., Okazaki, T., Koarai, A., Sugiura, H., Niihori, T., Aoki, Y., Nakayama, K., Matsumoto, K., Matsubara, Y., Yamamoto, M., Watanabe, A., Nukiwa, T., Ichinose, M.: Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer Sci* 2017. doi: 10.1111/cas.13233. [Epub ahead of print]

Hidaka, T., Ogawa, E., Kobayashi, E.H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Fujimura, T., Aiba, S., Nakayama, K., Okuyama, R., Yamamoto, M.: The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol* 18, 64-73, 2017. doi: 10.1038/ni.3614.

Shimizu, K., Fukushima, H., Ogura, K., Lien, E.C., Nihira, N.T., Zhang, J., North, B.J., Guo, A., Nagashima, K., Nakagawa, T., Hoshikawa, S., Watahiki, A., Okabe, K., Yamada, A., Toker, A., Asara, J.M., Fukumoto, S., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Inuzuka, H., Wei, W.: The SCFbeta-TRCP E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. *Sci Signal* 10, eaah4117, 2017. doi:10.1126/scisignal.aah4117.

Baird, L., Tsujita, T., Kobayashi, E., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K., Yamamoto, M.: A Homeostatic Shift Facilitates Endoplasmic Reticulum Proteostasis through Transcriptional Integration of Proteostatic Stress Response Pathways. *Mol Cell Biol* 37, e00439-16, 2017. doi: 10.1128/MCB.00439-16.

Hino-Fukuyo, N., Kikuchi, A., Iwasaki, M., Sato, Y., Kubota, Y., Kobayashi, T., Nakayama, T., Haginoya, K., Arai-Ichinoi, N., Niihori, T., Sato, R., Suzuki, T., Kudo, H., Funayama, R., Nakayama, K., Aoki, Y., Kure, S.: Dramatic response after functional hemispherectomy in a patient with epileptic encephalopathy carrying a de novo COL4A1 mutation. *Brain Dev* 39,337-340, 2017. doi: 10.1016/j.braindev.2016.11.006.

Ishida, N., Nakagawa, T., Iemura, S.I., Yasui, A., Shima, H., Katoh, Y., Nagasawa, Y., Natsume, T., Igarashi, K., Nakayama, K.: Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair. *Mol Cell Biol* 37, e00347-16, 2017. doi: 10.1128/MCB.00347-16.

Kobayashi, M., Funayama, R., Ohnuma, S., Unno, M., Nakayama, K.: Wnt-beta-catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Sci* 107,

1776-1784, 2016.

doi:10.1111/cas.13097.

Takahashi, Y., Suyama, Y., Matsuki, Y., Funayama, R., Nakayama, K., Kawata, M.: Lack of genetic variation prevents adaptation at the geographic range margin in a damselfly. *Mol Ecol* 25, 4450-4460, 2016.

doi:10.1111/mec.13782.

〔学会発表〕(計6件)

細金正樹、中山啓子. H3K27 ヒストン修飾によるエンハンサー制御のゲノムワイド解析. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/12/1.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

舟山亮、谷口肇、水間正道、藤島史喜、小林実、大沼忍、海野倫明、中山啓子. 大腸がんにおけるタンパク質シトルリン化酵素PADI2の役割. 第39回日本分子生物学会年会.2016/12/1.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

諸星茜、中川直、中山啓子. ユビキチン化による FACT 複合体の機能制御. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/12/1.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yujiao Yu, Akane Morohoshi, Tadashi Nakagawa, Keiko Nakayama. Molecular analysis of Amyotrophic Lateral Sclerosis associated Cyclin F mutants. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/12/1. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Tadashi Nakagawa, Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Keiko Nakayama. Reactivation of cell proliferation by continuous TGF- treatment. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/11/30.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

谷口肇、舟山亮、小林実、高館達之、阿部友哉、水間正道、藤島史喜、大沼忍、内藤剛、海野倫明、中山啓子. 大腸癌で発現が抑制される Peptidylarginine deiminase2 の機能解析. 第75回日本癌学会学術総会.2016/10/6.パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学医学系研究科細胞増殖制御分野
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

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

(3) 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

城田 松之 (SHIROTA, Matuyuki)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00549462

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