

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15251

研究課題名(和文)体細胞性ゲノム編集を応用した癌の根本治療への挑戦

研究課題名(英文)Challenging of development of cancer cell specific treatment by means of somatic genome editing

研究代表者

古川 徹 (Furukawa, Toru)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30282122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCRISPR-Cas9によるゲノム編集を体細胞性に応用し、癌における遺伝子異常を根本的に修復する新たな癌治療法開発として、CRISPR-Cas9法による変異特異的遺伝子ロックアウトおよび遺伝子変異部位修復により、異常活性化癌遺伝子の特異的破壊、正常遺伝子との入れ替えを行い、癌における遺伝子異常を根本的に修復する、これまでに無い極めて画期的な癌治療の実現を試みた。膵癌では90%でKRAS遺伝子の特定のコドンに機能亢進性変異を有しており、それを標的として膵癌細胞の増殖が抑制されるか検証し、結果、in vitroで変異配列特異的に種々の程度の増殖抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は3人に2人が罹患する疾患であり、依然として多くの場合不治であり、特に膵臓癌は予後が極めて不良で、5年生存率は10%未満であり、年間4万人近くが亡くなっている。膵臓癌は90%以上がKRASの機能亢進性変異を持ち、異常RASの機能を押さえないければ膵臓癌の根本的な治療にはならないことを示唆しているが、本研究成果はKRAS変異特異的ゲノム編集により膵臓癌細胞の増殖をコントロールできる可能性を示した。アデノウイルスで一過性体細胞性ゲノム編集を高効率に起こすことで臨床的な応用への可能性を拓き、これまでにない癌治療を実現できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a novel cancer cell-specific therapeutic procedure by means of targeting cancer cell-specific mutations via CRISPR-Cas9 method. Mutation-specific CRISPR-Cas9 was supposed to destruct activated oncogenes or replace defective tumor suppressor genes with functional normal genes. Most of pancreatic cancer cells harbor mutant KRAS genes in specific codons, so that we designed CRISPR-Cas9 vectors to target the mutated codons in the KRAS gene and found that they were effective for inhibiting proliferations of those cells in mutation specific manner.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓癌 ゲノム編集 CRISPR-Cas9 KRAS アデノウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌は遺伝子異常によっておこるが、異常遺伝子を根本的に修復することは極めて困難であり、もっぱら異常な遺伝子の機能を抑える、あるいは、機能喪失した遺伝子の機能を代償することが癌治療の戦略とされて来た。この状況を変えうる技術が 2013 年に発表された CRISPR-Cas9 を応用したゲノム編集技術である。CRISPR-Cas9 は標的とする遺伝子配列と相同のガイド RNA に Cas9 が誘導され、ゲノム DNA 上の標的配列部分を 2 重鎖切断する。切断された部位は non-homologous end joining (NHEJ) または homologous recombination (HR) により修復されるが、NHEJ では多くの場合、修復時の欠失挿入のためフレームシフト変異が生じて遺伝子機能が失われる。HR の際は標的部位の 5', 3' と同様の配列を持つ断片と入れ替えられる。ガイド RNA 配列は PAM 配列の 5' 側に隣接する任意のゲノム領域を設定することができて自由度が高く、また、PAM を含む配列特異性が高いので off-target 効果が少ない。Cas9 発現配列を含め核酸ベースで全てデザインおよび導入できるので極めて簡便である。癌では oncogene の機能亢進性変異あるいは tumor suppressor gene の機能喪失性変異がドライバーとなっているが、機能亢進性変異をもつ oncogene を標的として CRISPR-Cas9 による NHEJ を起こさせることにより異常な oncogene の機能を不活化することができ、また、機能喪失性変異をもつ tumor suppressor gene に対しては変異部位を野生型の配列と HR により入れ替えることが出来る。Oncogene の変異部位を野生型配列と入れ替えることも可能と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を応用し、癌における遺伝子異常を破壊するあるいは根本的に修復する新たな癌治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 変異特異的あるいは変異近傍配列標的 CRISPR-Cas9 ベクターの構築

単一ベクターにガイド RNA と Cas9 発現配列を組込むベクター (pCAS-Guide, Origene) を使用し、変異遺伝子配列に相当する、あるいは、変異近傍の野生型配列を標的とするガイド RNA をデザインして、U6 プロモーター下に挿入する。HR 用に野生型エクソンを含むゲノム配列を哺乳細胞での発現機能のないベクターにクローニングする。

2. CRISPR-Cas9 ベクターのトランスフェクション

構築した CRISPR-Cas9 ベクターを癌細胞株にリポフェクション法 (Life Technologies) でトランスフェクションする。変異特異的ベクターはそれのみあるいはセレクションマーカー入り HR 用ベクターを、変異近傍野生型標的ベクターは HR 用プラスミドとともにコトランスフェクションする。

3. CRISPR-Cas9 導入細胞の増殖アッセイ

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集細胞について MTT 法増殖アッセイを行う。

4. アデノウィルスベクター構築

高効率のゲノム編集を実現するため変異特異的ガイド RNA を有した CRISPR-Cas9 アデノウィルスベクターを構築する。

4. 研究成果

(1) 変異特異的あるいは変異近傍配列標的 CRISPR-Cas9 ベクターの構築

単一ベクター内にガイド RNA と Cas9 発現配列を組み込む pCAS-Guide ベクターを使用し、変異遺伝子配列に相当する、あるいは、変異近傍の野生型配列を標的とするガイド RNA をデザインして U6 プロモーター下に挿入した。標的配列は KRAS 遺伝子コドン 12 部分の配列とし、KRAS codon 12 は PAM 配列を一部含む形になっているため、PAM 配列を含む変異特異的ガイド RNA の構築が可能であった。

(2) CRISPR-Cas9 ベクターのトランスフェクションと増殖アッセイ

上記で構築した KRAS コドン 12 各種変異標的ベクターをリポフェクション法で膵癌細胞にトランスフェクションした。膵癌細胞は KRAS コドン 12 部分の変異配列を確認し、標的となる変異配列とミスマッチとなる配列のものをを用いてゲノム編集効果を比較できるようにした。結果、配列特異的に種々の程度で増殖効率抑制効果が認められた。本結果は変異特異的ゲノム編集により癌細胞の増殖をコントロールできる可能性を示すものと考えられた。

(3) アデノウィルスベクター構築

高効率で、かつ、導入量の調整がしやすく、また、一過性発現でホストのゲノムへのインテグレーションを起こさないアデノウィルスベクターによるゲノム編集治療実験を行うべく、当初計画に沿って、構築した KRAS 遺伝子変異特異的 pCas-Guide プラスミドベクターから KRAS 遺伝子コドン 12 の種々の変異パターンに対応したガイド RNA 発現システム及び Cas9 コーディング領域を切り出し、アデノウィルスプラスミドベクターにインフュージョン法によりクローニ

ングして、サンガーシーケンスにより正しくクローニングされていることを確認することで、アデノウィルスの骨格となる、*KRAS* 遺伝子コドン 12 の種々の変異パターンに対応したガイドRNA 発現システム及び Cas9 コーディング領域をもつコスミドベクターを構築し、293 細胞を使用してアデノウィルスに組み替え、mutant *KRAS* specific CRISPR-Cas9 adenovirus vector を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 古川 徹 膵癌のゲノム医療 外科 80(12):1234-1238, 2018. DOI: 10.15106/j_geka80_1234 (査読無)
2. 古川 徹 発癌の基礎研究-膵癌 update 臨床消化器内科 33(7):740-745, 2018. DOI : 10.19020/CG.0000000382 (査読無)
3. 古川 徹 慢性炎症と膵発癌 肝胆膵 77(3):673-677, 2018. (査読無)
4. 古川 徹 膵管内腫瘍における遺伝子異常 肝胆膵 75(4): 745-751, 2017. (査読無)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 古川 徹. 膵臓腫瘍の発生進展機構の解明 第29回日本消化器癌発生学会総会 2018年11月16日・17日 東京 (シンポジウム「がん病理—治療法開発のための複雑性の理解」指定招待講演)
2. 古川 徹. 早期膵癌の定義と分子基盤について 第56回日本癌治療学会学術集会 2018年10月18-20 横浜 (シンポジウム)
3. 古川 徹. 膵腫瘍のゲノム解析 第49回日本膵臓学会大会 2018年6月29-30 和歌山(ワークショップ3 膵腫瘍におけるゲノム解析—病態解明と臨床的意義)(指定演者)
4. Furukawa T. Targeting MAPK/ERK and Its Downstream in Pancreatic Cancer. 4th ARO-Japan and TSPA/TCTC-Taiwan Workshop 2018年5月11-12日 Taipei, Taiwan. (Invited speaker).
5. Furukawa T. Pathobiology of intraductal neoplasms of the pancreas. Pancreas2018 2018年4月26-28日 Baltimore, MD, USA. (Invited speaker)
6. Hirose K, Furukawa T. Clinicopathological relevance of SMAD4 and RUNX3 in pancreatic cancer. Pancreas2018 2018年4月26-28日 Baltimore, MD, USA. (Poster)
7. 古川 徹 ゲノムと病理 宮城県臨床細胞学会学術集会ランチョンセミナー 2018年2月4日 仙台市 (招待講演)
8. 古川 徹 膵腫瘍のゲノム異常 「病理専門医資格を担保した基礎研究医育成」自治医科大学病理学セミナー 2018年2月2日 福岡市 (招待講演)
9. 古川 徹 膵腫瘍の病理と臨床 第3回能代山本がん診療学術講演会 2018年1月19日 能代市 (招待講演)
10. Furukawa T. Signaling aberrations and their implications in pancreatic cancer. 2017 Asan Pancreatic Cancer Symposium 2017年11月15日 Seoul, Korea. (Keynote lecture; invited)
11. 古川 徹 IPMN由来浸潤癌とIPMN合併膵癌の病理学的知見 第22回日本外科病理学会学術集会 2017年11月10日 宇都宮市 (シンポジウム指定演者)
12. 古川 徹, 山本 雅一. 膵腫瘍におけるゲノム医療. 第25回日本消化器関連学会週間 2017年10月12-15日 福岡市 (ワークショップ24 (消化器外科学会・消化器病学会);指定演者)

13. 古川徹 膵管内腫瘍の分子病理 腫瘍別シンポジウム「肝胆膵腫瘍の新たな診断・治療」第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28-30日横浜市 (シンポジウム指定講演)
14. Furukawa T. Molecular Pathology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. 第48回日本膵臓学会大会 2017年7月14-15日 京都 (JPS-APA Sister Societies' Joint Symposium; Invited speaker).
15. Furukawa T. Pathobiology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. Joint Congress of 6th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association & 29th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. 2017年6月7-10日 Yokohama (Symposium 31: Optimal Management of Pancreatic Cystic Neoplasm; invited speaker)
16. Furukawa T. Activation of MAPK in pancreatic cancer-Its mechanism and implication. Japan-Korea-Taiwan Joint Meeting for Pancreatic Cancer in Wakayama. 2017年2月17日 Wakayama (Invited speaker).
17. 古川徹 がんにおけるゲノム解析のインパクト 第55回秋田県医師会医学講座 2017年1月14日 秋田市(招待講演)
18. Furukawa T. Subtype classification of IPMN and its impact on patient care. American Pancreatic Association Pre-Meeting “IPMN: Beyond Guidelines and Treatment.” 2016年10月26日 Boston MA, USA. (Invited speaker)

〔図書〕(計 6件)

1. 古川徹：膵・胆道腫瘍の発症機序 最新ガイドライン準拠消化器疾患診断・治療指針 pp.83-84. 佐々木裕(総編集)木下芳一、下瀬川徹、渡辺守(編)中山書店 東京 2018. 総ページ数480.
2. 古川徹：膵癌の前癌病変における研究の最前線 胆膵疾患診療の進歩 別冊医学のあゆみ pp.87-92. 岡崎和一(編)医歯薬出版株式会社 東京 2018. 総ページ数136.
3. 古川徹：膵・胆道癌の発症・進展機序 膵・胆道疾患診療の最前線 プリンシパル消化器疾患の臨床4 pp. 76-79. 佐々木裕、下瀬川徹(編)中山書店 東京 2018. 総ページ数352.
4. 古川徹：膵腫瘍関連遺伝子. 新膵臓病学 pp.162-165. 下瀬川徹(編)南江堂 東京 2017. 総ページ数528.
5. 古川徹：膵嚢胞性腫瘍. 新膵臓病学 pp.62-69. 下瀬川徹(編)南江堂 東京 2017. 総ページ数528.
6. Furukawa T. Molecular Alterations in Pancreatic Cancer. Pancreatic cancer. Kim Sun-Whe, Yamaue H (eds.) pp. 11-23. Springer Berlin Heidelberg 2017. DOI: 10.1007/978-3-662-47181-4_2. Print ISBN 978-3-662-47180-7 Online ISBN 978-3-662-47181-4. 総ページ数482.

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/188.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。