

令和元年6月18日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15588

研究課題名(和文)ゲノム編集技術を応用した新規遺伝子発現イメージング法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on development of the new gene expression imaging method that a genome editing technology is applied to

研究代表者

中神 佳宏 (Nakagami, Yoshihiro)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80347301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線同位体標識sgRNAはCas9タンパク質と複合体を形成しており、通常のRNAに比べ生体内での安定性は高いと思われる。標識sgRNA-Cas9タンパク質複合体について、HER2遺伝子に特異的に結合する能力のあるよう事前に設計することを試みた。しかしながら、この設計に思ったより難渋した。標識sgRNA-Cas9タンパク質複合体を担癌マウスに投与したものの、期待したほどは癌の放射能カウントが高くない、sgRNAの生体内での安定性が低いか、もしくは標識sgRNAの設計が不十分であったことが要因であると考えられた。尚、他施設からの<sup>64</sup>Cuの供給が滞ったためこれらを用いた実験は断念することとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個体における遺伝子発現を非侵襲的にリアルタイムで画像診断することができれば、病気の分子診断法としても、あるいは治療効果の確認法としても、従来にない画期的なツールになるものと期待される。従来の遺伝子発現イメージングは主に標識アンチセンスによるものであるが、これまでのところ大きな進展が得られていない。一方、「ゲノム編集」技術が分子生物学や細胞生物学の分野ではホットな研究テーマとなっている。我々は「ゲノム編集」で鍵となる因子であるガイド鎖RNA (sgRNA) を放射性同位元素で標識する方法を考案した。よって、この標識sgRNAを用いて新たな遺伝子発現画像法を開発し臨床応用することが可能と思われる。

研究成果の概要(英文)：Radiation isotope mark sgRNA forms Cas9 protein and a complex, and the stability more in vivo than normal RNA is thought to be high. About mark sgRNA-Cas9 protein complex, I tried that I designed it beforehand so that HER2 gene specifically had the ability to be connected. However, I suffered from this design than I thought. The radioactivity count of cancer was not high, and in vivo stability of sgRNA was low, or it was thought that it was a factor that a design of mark sgRNA was insufficient so as to have expected it although I gave mark sgRNA-Cas9 protein complex to the mouse with human cancer. In addition, the experiment using these will give it up because supply of <sup>64</sup>Cu from other facilities was delayed.

研究分野：放射線医学

キーワード：ゲノム編集 放射性同位元素

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析研究の結果、多くの病気と遺伝子との関連性が明らかになり、遺伝子を標的とした新しい治療および診断手法の開発が行われている。個体における遺伝子発現を非侵襲的にリアルタイムで画像診断することができれば、病気の分子診断法としても、あるいは治療効果の確認法としても、従来にない画期的なツールになるものと期待される。

我々は、以前、RNAi現象をきたすRNAであるsiRNA(二重らせんの小RNA)を用いて生体内の遺伝子発現イメージングを試み、一定の成果を得た(平成21~23年度、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)「放射性同位体標識siRNAを用いた生体内遺伝子発現イメージングに関する研究」)。

しかし、残念ながら、ドラッグデリバリー等の問題により未だ臨床応用に至っていないのが現状である。

一方、標的ゲノム部位を特異的に変更すること(削除、置換、挿入)ができる「ゲノム編集」は、生物学および医学研究者にとって非常に興味深い技術である(Bogdanove & Voytas, 2011; van der Oost, et al., 2013)。近年、植物の病変形成や適応免疫といった細菌のシステムを利用する2種類のゲノム編集技術が登場した。それが、TALEN(転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ)とCRISPR-Cas(CRISPR, CRISPR-Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins)である。CRISPR-Cas系では、Cas9タンパク質(DNA切断酵素)がガイド鎖RNA(single guide RNA(sgRNA); Cas9を標的的DNA配列まで導くRNA)と共同し、標的DNAを切断する。Cas9を応用したゲノム編集技術は、TALEN法など従来の技術よりも迅速・簡便であるため急速に普及し始めている。しかも、この技術は、sgRNAを用いることから、我々が以前siRNAで用いた標識法をほぼそのまま応用することができ、簡便に新規の遺伝子発現イメージングが可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

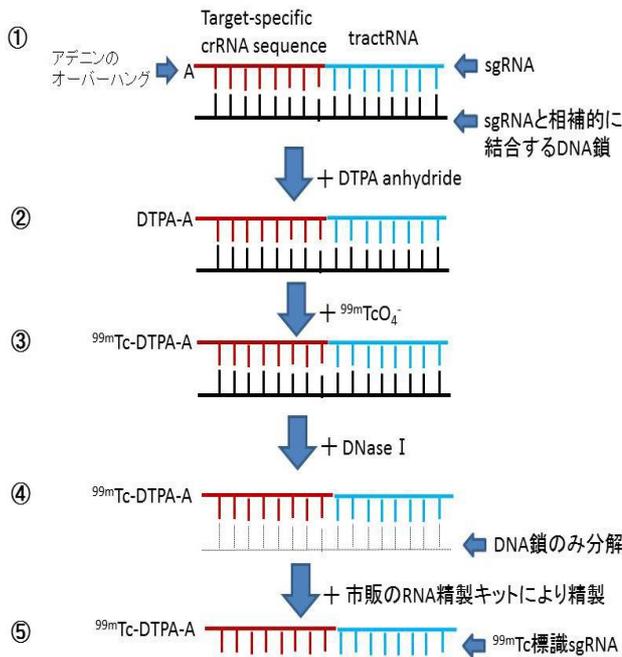
個体における遺伝子発現を非侵襲的にリアルタイムで画像診断することができれば、病気の分子診断法としても、あるいは治療効果の確認法としても、従来にない画期的なツールになるものと期待される。従来の遺伝子発現イメージングは主に標識アンチセンスによるものであるが、これまでのところ大きな進展が得られていない。

一方、近年、「ゲノム編集」技術が分子生物学や細胞生物学の分野ではホットな研究テーマとなっている。我々は「ゲノム編集」で鍵となる因子であるガイド鎖RNA(sgRNA)を<sup>99m</sup>Tc等で標識する方法を考案した。よって、この標識sgRNAを用いて本研究を発展させることにより、新たな遺伝子発現イメージング法を開発し臨床応用することが可能であると期待される。

## 3. 研究の方法

我々は、sgRNAの放射性同位体標識法を考案した(図1)。以下にその概略を示す。

<図1> single guide RNA (sgRNA) の放射性同位体標識法の概略



**single guide RNA (sgRNA)**は、**DNA** ターゲット配列に特異的に結合する **crRNA** 配列(赤)と、**Cas9** スクレアーゼに結合する **tracrRNA** 配列(青)によって構成されている。**sgRNA** と相補的に結合する **DNA**(黒)をアニーリングし **sgRNA/DNA2** 重鎖の合成を業者に依頼する。その際に **sgRNA** の 5' 末端(or 3' 末端)にアデニン(A)を 1 ~ 2 塩基オーバーハングしておく。の溶液に **DTPA anhydride**(ジエチレントリアミン五酢酸二無水物)をごく少量作用させると、**sgRNA** のオーバーハングにあるアデニンの側鎖の-NH<sub>2</sub> 基に **DTPA** の COOH 基が結合し(酸アミド結合) **DTPA-sgRNA/DNA** ができる。

の溶液にごく少量の塩化スズ(II)とともに <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> 370MBq を作用させると、**DTPA** のキレート作用により <sup>99m</sup>Tc と **DTPA** が結合し、**<sup>99m</sup>Tc-DTPA-sgRNA/DNA** ができる。尚、**sgRNA** に相補的に結合している **DNA** 鎖は、やの段階で **DTPA** や <sup>99m</sup>Tc が **crRNA** 配列や **tracrRNA** 配列にある重要な塩基に作用しないようにするための保護基としての役割を果たしている。

の溶液に少量の **DNase** (DNA 分解酵素) を作用させると、**DNA** 鎖のみが特異的に分解される。

の溶液を市販の **RNA** 精製キットにより精製すると **<sup>99m</sup>Tc-DTPA-sgRNA** が得られる。得られた **<sup>99m</sup>Tc-DTPA-sgRNA** に市販の **Cas9** タンパク質を加えることにより、**<sup>99m</sup>Tc-DTPA-sgRNA/Cas9 protein** 複合体を得る。尚、本例では <sup>99m</sup>Tc による標識法を示したが、<sup>99m</sup>Tc の代わりに <sup>62</sup>Cu や <sup>64</sup>Cu 等の陽電子放出核種を用いれば、**PET** 製剤用の **sgRNA** 標識法となる。

(1) 293T 細胞群を液体培地上で培養後、それぞれの細胞群の対数増殖期に様々な遺伝子(例えば LacZ や EGFP) を強制発現させるベクターを用いて各遺伝子を過剰発現する細胞系列を作成する。一方、それぞれの遺伝子に特異的にハイブリダイズするように設計した **sgRNA/DNA** を合成する。そして、それぞれの **sgRNA** に対し <sup>99m</sup>Tc を標識する。<図1>のように我々が考案した方法を用いることにより **sgRNA** の 5' 末端(or 3' 末端)のみに特異的に標識することが可能である。そして、遺伝子高発現群と低発現群のそれぞれに等量の標識 **sgRNA** + **Cas9** タンパク質複合体を加え一定時間(30分~24時間)<sup>37</sup>、5%CO<sub>2</sub> 中でインキュベートする。

その上でそれぞれの細胞群から培地を取り除き、PBSで3回wash、適切な細胞溶解バッファを用いてwhole cell lysateを取り出し放射能カウントを測定する。またそれぞれの総タンパク濃度もBCA法により測定し、単位タンパク量(細胞数に比例)当りのカウントに換算し、放射能を比較する。これらの実験により、遺伝子特異的にこの標識**sgRNA**が結合しているかどうかを確認できる。

(2) 放射性同位体標識sgRNAはCas9タンパク質と複合体を形成しており、通常のRNAに比べ生体内での安定性は高いと思われるが、in vivoの場合はin vitroの場合に比し安定性が低くなる恐れもある。当施設での予備実験によると、標識sgRNAのドラッグデリバリーシステムとしてはアテロコラーゲンを用いた方法が適すと考えられた。その手法の最適な条件設定を解明し生体内における安定性と安全性の向上を目指した。

まず、<図1>の方法で得た標識sgRNA-Cas9タンパク質複合体(HER2のような癌遺伝子に特異的に結合する能力のあるよう設計)を通常のヌードマウスに尾静脈より静注する。その際、標識sgRNAを適切なトランスフェクション試薬(アテロコラーゲン等)により処理しsgRNAの生体内での安定性を向上させておく。一定時間の後、そのマウスを解剖、各臓器別に放射能カウントと重量を測定し、そのsgRNAの体内分布を決定しておく(所謂、バイオディストリビューションの決定)。

一方、ヌードマウスに癌を移植し担癌動物を作成する。通常のヌードマウス及び担癌ヌードマウスそれぞれにおいて、標識 sgRNA-Cas9 タンパク質複合体(癌遺伝子に特異的に結合する能力のあるよう事前に設計)を尾静脈より静注する。その際、標識 sgRNA をアテロコラーゲンにより処理し sgRNA の生体内での安定性を向上させておく。一定時間後、そのマウスを解剖、各臓器別に放射能カウントと重量を測定する。

また、線放出核種である<sup>64</sup>Cu 標識 sgRNA については、他の金属による標識と異なり、抗腫瘍効果があると期待される。担癌マウスにこれを投与し、一定時間の後、腫瘍径を計測すると共に、動物用 CT や MRI 装置で腫瘍サイズを評価し、治療効果を判定する。

#### 4. 研究成果

##### (1)「3.(1)」の成果

sgRNA + Cas9 タンパク質複合体の<sup>99m</sup>Tcの標識率にバラツキがあり、どのような場合に標識率が高くなるのかその原因分析に未だ至っていない。また、遺伝子高発現群と低発現群の放射能差が少なく、遺伝子特異的に標識 sgRNA が結合しているかの確認には至らなかった。

##### (2)「3.(2)」の成果

標識sgRNA-Cas9タンパク質複合体について、HER2のような癌細胞に高発現している遺伝子に特異的に結合する能力のあるよう事前に設計することを試みた。しかしながら、この設計に思ったより難渋し、実験計画の大幅な遅れをきたした。また、この標識sgRNAをトランスフェクション試薬(アテロコラーゲン等)により処理しsgRNAの生体内での安定性を向上させ、マウスに投与しそのsgRNAの体内分布を決定する予定であったが、マウス投与前に行ったin vitroの実験で十分な安定性を得ることは難しかった。よって、標識sgRNA-Cas9タンパク質複合体をそのまま担癌マウスに投与することとした。投与後、マウスを解剖し、各臓器の放射能カウントを測定したが、期待したほどは癌の放射能カウントが高くない、sgRNAの生体内での安定性が低いか、もしくは標識sgRNAの設計が不十分であったことが要因であると考えられる。

尚、線放出核種である<sup>64</sup>Cu 標識 sgRNA については、他施設からの<sup>64</sup>Cuの供給が滞ったためこれらを用いた実験は断念することとなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Relationship between tumor volume and quantitative values calculated using two-dimensional bone scan images. Hosokawa S, Inoue K, Takahashi Y, Kawakami K, Kano D, Nakagami Y, Fukushi M. Radiol Phys Technol. 2017 Dec;10(4):496-506. doi: 10.1007/s12194-017-0423-4. 査読有

A simulation study for estimating scatter fraction in whole-body 18F-FDG PET/CT. Hosokawa S, Inoue K, Kano D, Shimizu F, Koyama K, Nakagami Y, Muramatsu Y, Fukushi M. Radiol Phys Technol. 2017 Jun;10(2):204-212. doi: 10.1007/s12194-016-0386-x. 査読有

Development of a double-stranded siRNA labelling method by using 99mTc and single photon emission computed tomography imaging. Kano D, Nakagami Y, Kurihara H, Hosokawa S, Zenda S, Kusumoto M, Fujii H, Kaneta T, Saito S, Uesawa Y, Kagaya H. J Drug Target. 2017 Feb;25(2):172-178. doi: 10.1080/1061186X. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

Y. Nakagami, D. Kano, M. Kusumoto, Y. Kojima. A Novel Cancer Imaging Tracer for Fumarate Respiration European Association of Nuclear Medicine 2016, Barcelona Spain, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://radiology.dokkyomed.ac.jp/research/>

## 6 . 研究組織

研究分担者

(1) 氏名：原 孝光

ローマ字氏名：HARA , takamitsu

所属研究機関名：群馬県立県民健康科学大学

部局名：診療放射線学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70464542

(2) 氏名：井上 登美夫

ローマ字氏名：INOUE, tomio

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学研究科

職名：客員教授

研究者番号(8桁): 80134295

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。