

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15045

研究課題名(和文) CRISPRスクリーニングによるがん微小環境下での浸潤関連遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Development of intercellular device to record the extracellular stimuli with self-targeting CRISPR-Cas9

研究代表者

中出 翔太(Nakade, Shota)

広島大学・理学研究科・研究員

研究者番号：70795509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳がん細胞におけるCRISPR-Cas9を用いたノックアウトスクリーニングの基盤となる遺伝子改変の効率化技術としてLoAD法を開発した。同法は、ゲノム編集領域にDNAの二本鎖切断(DSB)修復因子を集積させることで遺伝子改変を効率化を可能にする。我々はこれにより培養細胞におけるノックイン効率の上昇、同時多重ノックインの実用化など多岐に応用可能であることを証明した。また、ウイルスベクターを用いてCas9タンパク質を恒常的に発現する乳がん細胞株の作製などの整備を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LoAD法の開発によって、ゲノム編集によるノックイン効率を大きく上昇させることに成功した。これは遺伝子改変細胞株の樹立効率を引き上げ、ゲノム編集を用いた遺伝学的解析に必要な期間を大幅に短縮する。また、CRISPR-Cas9の変異導入効率や遺伝子導入効率が低い細胞種でも改変株作製が高効率に可能になった。さらに同法は、局在化させるDSB修復遺伝子をカスタマイズすることで、オーダーメイドな遺伝子改変を誘導する手法の発展に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we established the efficient method of genome editing serving as a platform for knock-out screening with CRISPR-Cas9 in breast cancer cells, which is called Local Accumulation of DSB repair molecules (LoAD). It enabled efficient gene modification by accumulating double-strand break (DSB) repair molecules into the genome editing region. We achieved the improvement of gene knock-in, the practical application of simultaneous triple knock-in, and induction of short deletion through LoAD method. Also, we provided the Cas9-expressing stable cell lines of breast cancer cells using the lentiviral vector for CRISPR Screening.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 CRISPR-Cas9 がん細胞 スクリーニング ゲノム 癌

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

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞などから発生する固形がんが他臓器へ転移するまでには、細胞外マトリックス (ECM) などで構成された周辺組織を破壊して血管やリンパ管まで浸潤する過程を必ず經由する必要がある。そのため、がん細胞が浸潤に至るまでの詳細な遺伝子変異を解析することは、新規がん治療法の確立を目指す上で重要な課題である。これらの遺伝子変異について網羅的に実施した先行研究として、Burleigh AらがBreast Cancer Res誌 (2015年)に報告した研究(引用1)がある。彼らはsiRNAライブラリーをコードしたレンチウイルスベクターを用いて21,121遺伝子をノックダウンした乳腺上皮細胞と線維芽細胞を共培養することで、乳腺上皮細胞の増殖を制御する遺伝子を網羅的に特定している。その結果として、線維芽細胞と相互作用して上皮細胞の増殖を制御する47個の遺伝子を特定し、軸索に関係する受容体やエンドセリン受容体などの多様な膜貫通タンパク質が細胞増殖に関係することを明らかにした。

このように、網羅的な遺伝子破壊によるスクリーニングは、がん細胞と微小環境との相互作用を解析する場合において非常に強力な手法となり得ることは明白であり、浸潤メカニズムを詳細に解析する場合においても同様である。そこで、CRISPR-Cas9を用いた全ゲノムスケールのノックアウトスクリーニングを使用することで、がん微小環境に依存して浸潤に関わる遺伝子を網羅的に特定した上で、遺伝子変異と微小環境との相互作用がもたらす浸潤能の変化を解析することを目指した。

### 2. 研究の目的

がん細胞の増殖や浸潤は、がん細胞への蓄積される遺伝子変異とその周囲を取り囲む微小環境との相互作用によって促進されるが、これらを詳細に解析する手法は極めて限定的だった。そこで本研究では、ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9を用いた全ゲノムスケールのノックアウトスクリーニングによって、全ての遺伝子にくまなく変異が導入されたがん培養細胞のライブラリーを作製後、様々な環境下で細胞浸潤アッセイを実施することで、増殖や転移能の上昇に関連した遺伝子変異を網羅的に同定することを目的とした。その成果は、微小環境と関連したがん細胞の浸潤メカニズムについて巨視的な解明が期待できると同時に、培養細胞と周囲環境との関係を立体的に解析することが可能な革新的スクリーニングの開発にも繋がると考えられる。

### 3. 研究の方法

平成29年度はノックアウトスクリーニングの基盤整備のため、培養細胞における高効率な遺伝子改変法の効率化の確立を進めた。本研究に利用する乳がん細胞株(MCF7, MDA-MB-231)は、現状でトランスフェクション効率が低く、細胞株の効率的な遺伝子編集が困難だった。そこで、培養細胞でのゲノム編集効率を上げるためにCRISPR-Cas9のsgRNAに対して、RNA結合タンパク質であるMS2コートタンパク質の認識配列をループに組み込むことで、MS2タンパク質と融合した修復遺伝子が集積することを利用し、二本鎖切断(DSB)末端周辺にDSBの修復遺伝子を効果的に局在化させる手法を開発した。

平成30年度は、29年度の研究成果を取りまとめた後、スクリーニング用のがん細胞株樹立及びCRISPRスクリーニングを実施することを目指した。スクリーニングに用いるレンチウイルスベクターはCas9をコードしていないため、まずレンチウイルスベクターによってCas9恒常発現遺伝子を組み込んだがん細胞株を作製した。今後、スクリーニング結果をがんNGSデータと比較して浸潤関連遺伝子の詳細な解明を図る予定である。

### 4. 研究成果

#### 【平成29・30年度】

ノックアウトスクリーニングの基盤整備のため、培養細胞における高効率な遺伝子改変法の効率化の確立を進めた。前述の通り、本研究に利用する乳がん細胞株(MCF7, MDA-MB-231)は、現状でトランスフェクション効率並びにノックイン効率が芳しくなく、スクリーニングのための検証に伴うがん細胞の効率的な改変を実現することが必要になったためである。

#### (1) 任意のDSB修復を誘導する新規CRISPR-Cas9技術の開発に成功

DSB修復経路に関連する遺伝子を過剰発現することでゲノム編集の効率を上昇させたという報告(引用2)をもとに、ノックイン領域にDSB修復遺伝子を効果的に集積させることによってノックイン効率を上昇させる新規技術を考案し、これをLocal Accumulation of DSB repair molecules (LoAD)と命名した。本法は、切断活性を不活化したCRISPR-dCas9による遺伝子の転写活性化システム(SAM)を基盤にしており(引用3)、RNA結合タンパク質であるMS2コートタンパク質の認識配列をループに含んだsgRNAに対して、MS2タンパク質と融合した修復遺伝子が集積することを利用し、DSB末端周辺に修復遺伝子を効果的に局在化させる。この手法は我々が以前開発した短い相同配列を利用したノックイン法(PITCh)(引用4)に限らず、あらゆるゲノム編集を効率化することが可能であると考えた。

まず、レポーターアッセイを用いたスクリーニングによって MMEJ を増強する遺伝子を同定した。ヒト培養細胞に PITCh 法を用いて蛍光タンパク質をノックインする際に LoAD を適用し、FACS による定量解析によってノックイン効率上昇の効果を実証した(図1)。また、次世代シーケンス解析(NGS)によって正確に連結されたノックインアレルの頻度を解析した。多くの候補遺伝子でスクリー

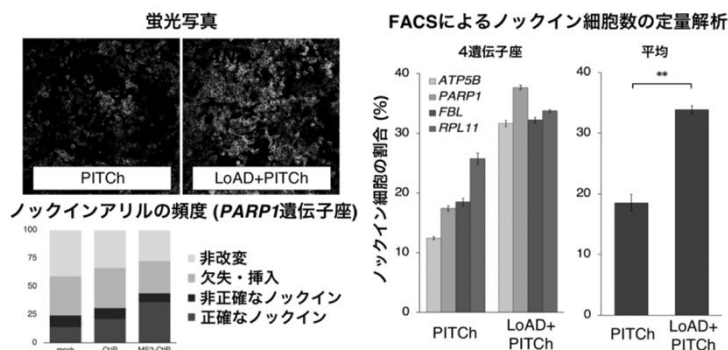


図1. LoADによるノックイン効率の上昇

ーニングを行った結果、CtIP が Exo1 よりも強力な MMEJ 増強因子であることが分かった。HEK293T 細胞で LoAD による CtIP 局在化の効果を確認したところ、CtIP の局在化は単純な過剰発現と比較して約 2 倍ノックイン効率を上昇させた。さらに CtIP の局在化は、正確な MMEJ 修復によるノックインアレルの頻度が約 2.5-5 倍上昇させた。加えて LoAD 法の実用性を証明するため、薬剤選抜なしの同時三重ノックインを 1%の効率で樹立した。また応用例として、CtIP の局在化によって HR や一本鎖 DNA オリゴのノックインなどの効率化を実現した。さらに、ノックアウトを適用する際に Trex2 を局在化することで、短い欠失を優先的に導入することが可能であることも証明している。

【平成 30 年度】

## (2) スクリーニングの基盤整備及び Cas9 恒常発現株の樹立

ウイルスを使用した実験については、所属研究室の設備完成までに想定よりも時間を要したこと、また本研究室ではウイルス実験のノウハウが未整備であったため、ウイルス実験に必要なマテリアルやプロトコルの整備等に時間と費用を要し、スクリーニングを適用する段階には至らなかった点により、スクリーニングの基盤整備の完了までに留まった。Doench JG らが Nat Biotechnol 誌(2016 年) (引用 5)に報告したプロトコルに準じて、乳がん細胞である MCF7 と MDA-MB-231 における sgRNA ライブラリー (Human CRISPR Knockout Pooled Library) 及び Cas9 恒常発現株作製のレンチウイルスベクター (lentiCas9-Blast) の力価評価を実施した。これらのレンチウイルスベクターには、それぞれ Puromycin (Human CRISPR Knockout Pooled Library) と Blasticidin S (lentiCas9-Blast) の抗生物質耐性遺伝子がコードされており、これらを導入した培養細胞については抗生物質で選抜することが可能である。そこで、まずウイルスベクターを導入した乳がん細胞に抗生物質を 5 日間処理することで生存細胞の数を測定し、抗生物質無処理の導入細胞と細胞数を比較することによって感染率を計算し、スクリーニング及び Cas9 タンパク質恒常発現株の作製に必要なウイルス量を推定した。これに続いて、乳がん細胞株に lentiCas9-Blast ベクターを適用して約 8 日間 Blasticidin S で選抜することで、Cas9 タンパク質恒常発現株の作製を実施した。以上の成果により、スクリーニングに関連した環境整備が完了した。

【引用】

1. Burleigh et al., Breast Cancer Res, 17:4, 2015.
2. Takayama et al., Nucleic Acids Research, 45: 5198-5207, 2017.
3. Konermann et al., Nature, 517, 583-588, 2015.
4. Nakade et al., Nat Commun. 5, 5560, 2013.
5. Doench et al., Nat Biotechnol, 34, 2, 2016.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakade, S., Mochida, K., Kunii, A., Nakamae, K., Aida, T., Tanaka, K., Sakamoto, N., Sakuma, T., Yamamoto, T. (2018). Biased genome editing using the local accumulation of DSB repair molecules system. 査読有, Nat Commun. 9, 3270.

〔学会発表〕(計 6 件)

Nakade, S., Mochida, K., Kunii, A., Nakamae, K., Aida, T., Tanaka, K., Sakamoto, N., Sakuma, T., Yamamoto, T. (2018). Parallel generation of multiplex knock-in cell collections using CRISPR-Cas9 assisted by locally enhanced MMEJ. FASEB Science Research Conference 2018, Genome Engineering: Cutting Edge Research and Applications, Florence, Italy.

Nakade, S., Mochida, K., Kunii, A., Nakamae, K., Aida, T., Tanaka, K., Sakamoto, N., Sakuma, T., Yamamoto, T. (2018). Biased genome editing using the LoAD (local accumulation of DSB repair molecules) system. CHSL meeting, 2018 Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Nakade, S., Sakuma, T., Nakamae, K., Yamamoto, T. (2017). Selective choice of MMEJ repair pathway and its accuracy profile during the process of PITCH knock-in. CHSL meeting, 2017 Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

中出翔太、持田圭次、中前和恭、相田知海、田中光一、坂本尚昭、佐久間哲史、山本卓「LoADシステム：ゲノム編集において任意のDSB修復経路を誘導する汎用的手法」『第三回ゲノム編集学会』、大阪、2018年6月

中出翔太、中前和恭、佐久間哲史、山本卓「PITCH法によるノックインの過程で生じるDSB修復経路の選択とその正確性」、『第二回ゲノム編集学会』、002、大阪、2017年6月

中出翔太、中前和恭、佐久間哲史、山本卓「短い相同配列を介した遺伝子ノックインにおいて選択されるDSB修復経路の解析」、『ConBio2017』、2PW03-2、神戸、2017年12月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

広島大学 分子遺伝学研究室

<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smg/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。