

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07701

研究課題名(和文) ゲノム編集による染色体異常誘導系を用いた大腸がん進展に関わるゲノム構造異常の解析

研究課題名(英文) Induction of chromosome aberrations by Pulse Genome Editing system in mouse intestinal tumor

研究代表者

高野 洋志 (TAKANO, Hiroshi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・主任研究員

研究者番号：00241555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんの進展における染色体構造異常の役割を実験的に明らかにするために、一過性ゲノム編集によるコンディショナル・ノックアウトシステムを開発し、反復配列B1 SINEを標的としてゲノム編集を行うことにより染色体異常を誘導する新たなマウス実験系を確立した。本システムでは、APC-Kras変異マウスの小腸と大腸に多数の腫瘍が生じ、さらに染色体異常を誘導すると腫瘍形成が亢進したが、生存期間内に浸潤・転移は認められなかった。野生型マウスやAPC変異マウスでは染色体異常を誘導しても腫瘍形成は促進されないことから、Kras変異は染色体断片化に際して腫瘍細胞の生存に有利に働いていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのがんで見られる染色体増幅や欠失を完全に再現するマウスモデルを作製することは、シンテニーの問題により困難であり、これまでに、がんモデル動物を用いて組織・個体レベルで評価したという報告は無い。本研究で開発したシステムは、大腸がんモデルマウスで、ある程度ランダムに染色体異常を誘導し、がんの悪性を指標にしてスクリーニングを行い、原因となるCNAやその他の遺伝的変化を、ヒト大腸がんのCNAと比較することにより、個体レベルでの評価を行うものである。本研究で用いる手法は、他のがん種にも応用可能であり、それぞれのがんの発生・進展メカニズムの解明ならびに診断や治療法の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：In order to demonstrate the role of structural chromosome abnormality in colorectal cancer progression, we developed a conditional knockout system by transient genome editing and targeted B1 SINE repetitive sequences to induce chromosomal breakage and rearrangement. KrasG12D mutation promoted intestinal tumorigenesis, including colon, in the conditional genome-editing APC mutant mice, and B1 SINE targeted genome-editing did not enhanced tumor formation in wild-type and APC mutant mice but in APC-Kras mutants, in which, however, no invasion or metastasis was observed because of early death. These results suggest that Kras mutations give the tumor cells selective advantages for growth and survival survival during chromosome damage and rearrangement.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん マウスモデル 染色体異常 ゲノム編集 APC Kras B1 SINE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは、発生初期に APC 遺伝子の不活化が生じ、その後 KRAS、TP53、Smad4 等の遺伝子変異が蓄積することにより進展することが知られている。しかし、マウス個体においてそれらの変異を再現しても、ヒト進行大腸がんで生じる遠隔転移を伴う進行がんを効率よく発生させることはできないことから、遺伝子変異以外の関与が示唆される。

一方、多くのヒトがん細胞では、ゲノムの増幅や欠失によるコピー数変化 (CNA) が認められ、がんの進展に寄与すると考えられてきた。しかしながら、ヒト臨床検体のゲノム解析のみでは、検出された多くのゲノム構造の変化が、がんの進展の間に蓄積したランダムな変化 (パッセンジャー) なのか、原因となる役割を演ずる変化 (ドライバー) なのかを区別することはできないため、適切な解析プラットフォームを構築することが必要である。

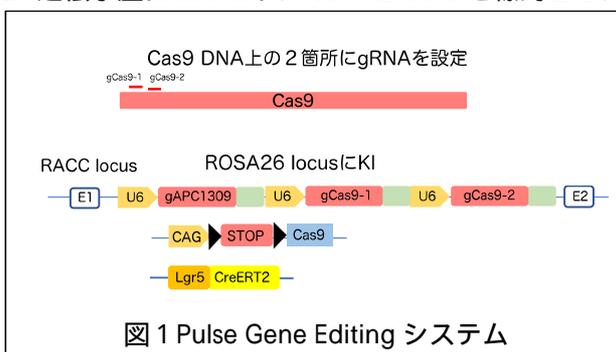
2. 研究の目的

本研究は、大腸がんの進展に関わるゲノム構造の異常を明らかにすることを目的として、ゲノム編集により染色体異常を誘導する新たな実験系を開発し、大腸がんモデルマウスに導入する。これにより、CNA をはじめとするゲノム異常が実際にがんの進展に寄与することを実証し、さらに、同定されたゲノム異常を詳細に解析することにより、大腸がん進展の鍵となる遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 一過性ゲノム編集 (Pulse Genome Editing) マウスの作製

マウス受精卵でのゲノム編集により、ROS26 遺伝子座に APC コドン 1309 と Cas9 を標的としたガイド RNA 発現ユニット (U6sgAP1309 および U6sgCas9) をノックインしたマウスを作製した (図 1)。このマウスに Lgr5CreERT2 (タモキシフェン誘導型の腸幹細胞特異的 Cre 発現系) と R26-CAG-LSL-Cas9 (Cre 誘導型 Cas9 発現系) を交配により導入した。このシステムではタモキシフェン投与により Cre が活性化すると、LoxP 間が切り出されて Cas9 が発現し、APC と同時に Cas9 が挿入・欠失変異により破壊されるので、ゲノム編集は一過性となる。



(2) B1 SINE ガイド RNA 発現マウスの作製

マウス成体において染色体異常を誘導するために、ゲノム上に 1200 ヶ所の標的部位が存在する B1 SINE ガイド RNA のコンディショナル発現ユニットをマウス受精卵でのゲノム編集により Hipp11 遺伝子座にノックインした。

(3) マウスにおける消化管腫瘍形成の解析

Lgr5CreERT2;R26-CAG-LSL-Cas9 システムによるコンディショナル APC、Kras、B1 SINE 変異導入/ゲノム編集マウスを交配により作製し、8 週齢で 4-hydroxy tamoxifen を 5 日間連続皮下投与することにより消化管腫瘍形成を誘導し、腫瘍数、腫瘍サイズ、腫瘍形成の時期、浸潤・転移の有無など、組織学的・免疫組織学的解析を行う。

(4) 染色体構造異常の解析

消化管腫瘍のパラフィン切片上で、マウス第 1 番および第 18 番染色体の whole chromosome probe を用いた FISH を行うことにより、染色体構造異常を検出した。

4. 研究成果

(1) Puls Genome Editing による APC コンディショナル・ノックアウト

APC ガイド RNA のみを発現するマウスと比較して、APC と Cas9 のガイド RNA を発現するマウスでは腫瘍数が少なく、Cas9 の発現を一過性にするにより、腫瘍数が抑えられた (図 2)。Cas9 の発現消失は免疫染色で確認した (図 3)。また、腫瘍のシーケンズ解析により、Cas9 陰性腫瘍では Cas9 のフレームシフト変異、Cas9 陽性腫瘍ではインフレーム deletion が生じていることを確認した。従来の APC コンディショナル・ノックアウトマウスである APC580S/S マウスは、タモキシフェン投与後 16 日目には回腸に多数の腫瘍が生じ、8 週目にはほとんどが致死

となるが、一過性ゲノム編集による APC コンディショナル・ノックアウトマウスは腫瘍数が少なく、投与後 20 週を超えても半数以上が生存するため、長期にわたる進展過程の解析に有効である。

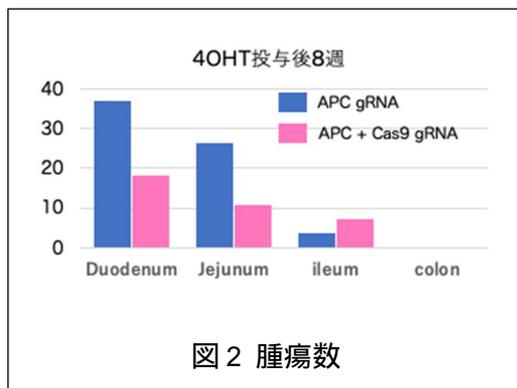


図 2 腫瘍数

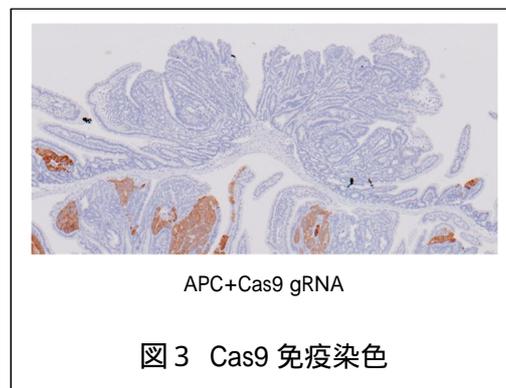


図 3 Cas9 免疫染色

(2) B1 SINE を標的としたゲノム編集はマウスの発生と正常な細胞の増殖に toxic である。反復配列を標的としてゲノム編集を行うと、大規模に染色体が断片化するので、ほとんどの細胞は死ぬと予想される。実際に、B1SINE を標的としてマウス受精卵でゲノム編集を行うと、2cell に発生しないことから、マウス生体においてコンディショナルにゲノム編集を行う必要性が再確認された。ゲノム編集により ROSA26 遺伝子座あるいは Hipp11 遺伝子座への B1 SINE ガイド RNA 発現のユニットのノックインを試みたが、目的とするマウスを作製することはできなかった。その一因として、反復配列を標的としたガイド RNA の恒常的な発現がマウスの発生に有害であると考え、コンディショナルに B1 SINE ガイド RNA を発現するユニットを Hipp11 遺伝子座にノックインにした結果、目的とするマウスを樹立することができた。このマウスに LSI-Cas9 と Lgr5CreERT2 を導入し、タモキシフェン投与後 8 週で解析を行った。コントロールマウスと比較して、B1SINE ゲノム編集マウスの回腸では、Cas9 を発現しているクリプト-villus unit の数が少なく、多くの細胞が増殖停止あるいは細胞死に至ることが示唆された。

(3) B1 SINE を標的としたゲノム編集は染色体構造異常を誘導し、APC-Kras 変異による消化管腫瘍の形成を促進する

APC コンディショナル KO マウスでは小腸に多数の腫瘍が形成されるが、大腸腫瘍は形成されない。APC 変異に KrasG12D 変異が加わると小腸腫瘍の形成が促進され、大腸における腫瘍形成が認められた。さらに、APC 変異に KrasG12D 変異に加えて B1 SINE を標的としたゲノム編集により染色体異常を誘導すると消化管腫瘍の形成がさらに亢進した (図 4)。これらの腫瘍で染色体構造異常が生じていることを Whole Chromosome probe を用いた FISH により確認した (図 5)。APC 変異マウスにおける消化管腫瘍形成は、染色体異常を誘導しても亢進せず、大腸腫瘍も認められなかった。野生型マウスでは染色体異常を誘導しても腫瘍は形成されなかった。このことから、Kras 変異は染色体断片化・構造異常が生じても細胞の生存・増殖に有利に働くことが示唆された。

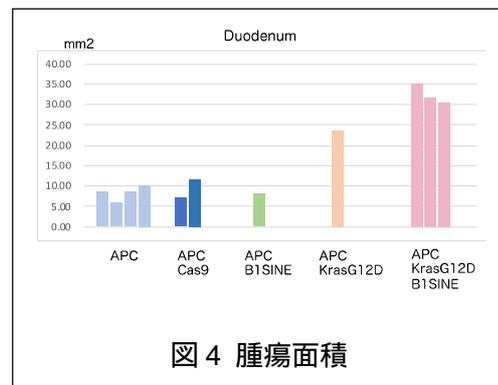


図 4 腫瘍面積

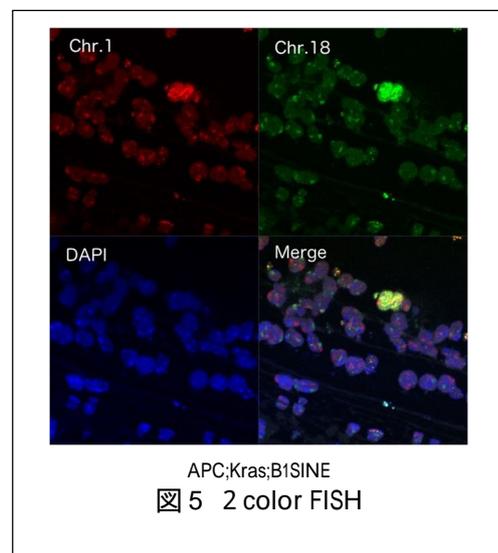


図 5 2 color FISH

本研究の結果は、染色体構造異常が APC / KrasG12D 変異による腫瘍形成を促進し、大腸腫瘍の形成に関与していることを示している。しかしながら、生存期間内 (タモキシフェン投与後 4 週) では浸潤・転移は認められず、さらに長期に経過観察が行えるようにタモキシフェンの投与方法等を検討し、がんの進展との関連を明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------