

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K19625
研究課題名（和文）肝発がん経路を解明するためのゲノム編集によるがん抑制因子のスクリーニング系の開発

研究課題名（英文）CRISPR-Cas9 based screening for essential tumor suppressors in liver carcinogenesis

研究代表者
山本 雄介（Yamamoto, Yusuke）
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：60768117
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子変異の機能解析は細胞株などを用いた研究で有用な報告も見られるが、同定された遺伝子変異が、実際はどの程度、どのように発がんや転移能の獲得に寄与しているかは不明な点が多く、正常細胞に対してCRISPR-Cas9を用いた遺伝子変異を多段階的に導入することによるがん化の過程の網羅的探索は見受けられない。本研究では CRISPR-Cas9を用い正常細胞に対して複数の多段階的な遺伝子変異を導入し、発がん過程に関与する遺伝子変異の寄与率の定量的な解析を行う。ゲノムの異常を正常細胞において正確に反映し、再現することが可能となりドライバー遺伝子の腫瘍形成過程における実際の機能の検証を実現する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR-Cas9システムのガイドRNAの作製の後、ガイドRNAの細胞への導入と遺伝子欠損株の単離に成功している。正常細胞の条件検討の段階として、がん細胞を用いた実験を行っており実験系の確立を目指している。多数の遺伝子に対して同様の手法を適用することができ、研究の進行については加速度的に対応することが可能となる。その上で、遺伝子変異を導入した細胞の安定培養、動物モデルの作製についても準備を行なっていく。近年開発されている一塩基変異を誘導するCRISPR-Cas9遺伝子編集技術との融合、比較実験の検証により更なる精密医療へと繋がっていくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：A large number of research projects identified genetic mutations in the process of carcinogenesis, and there have been some useful findings of studies using cancer cell lines. With next generation sequencing, genetic variants in a variety of cancers have been identified and shown to have an impact on carcinogenesis; however, it is still unclear how the mutations essentially influenced the carcinogenesis and their metastatic potential. In this research project, we introduced and quantitatively analyzed the contribution of genetic mutations involved in the carcinogenic process by CRISPR-Cas9, in order to knockout the tumor suppressor genes in primary epithelial cells, and examined the effect of each gene on carcinogenesis. Also, we tried to recapitulate the multi-step carcinogenesis in vitro. This study enables us to accurately reflect and reproduce genomic aberrations in normal cells, and to achieve validation of the actual function of driver gene mutations.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん抑制遺伝子 上皮細胞 CRISPR-Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の起源は遺伝子の異常であり、多くの場合は複数の遺伝子異常が蓄積されることによりがん化が引き起こされることは周知となっている。この概念は、1988年にVogelsteinらにより大腸がんの発生における遺伝子変異という報告から、多段階発がん説として提唱された。以来、がんと遺伝子との研究は、がん発生起源の歴史に膨大な足跡を残している。2000年代初頭にヒトゲノム全配列が解読され十数年が経過し、ゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサー技術などのゲノム解析技術は飛躍的な発展を遂げている。しかし、同定されたがんの遺伝子変異の綿密な機能解析は行われておらず、実際はどの程度、また、どのように発がんや転移能の獲得に関与するかについては不明な点が多い。近い将来には、がん診断においてもゲノム解析が診断の主流となり、臨床現場への応用が予想されることから、そのメカニズムを正確かつ網羅的に解析することは喫緊の課題と言える。

2. 研究の目的

- 1.) CRISPR-Cas9 を用い、正常細胞に対して複数の多段階的な遺伝子変異を導入し、実際の病態に近い発がんモデルを作成する。
- 2.) 発がん過程に関与する遺伝子変異についてその寄与率を定量的に解析する。
- 3.) 発がん細胞を免疫不全動物へ移植することにより、生体内での腫瘍の形成、また薬剤の効果などを検証する動物モデルを作製する。

上記のように、本研究では正常細胞に複数の遺伝子を多段階的に CRISPR-Cas9 でゲノム編集したモデルを樹立することで、より詳細かつ特異性の高い実験系を計画することが可能となる。

3. 研究の方法

[1. CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA の作製]

当初は肝細胞を用いた検討を考慮に入れていたが、使用する細胞の簡便さから肺の上皮細胞を用いた検討に変更した。大規模ゲノム配列解読の研究から肺がんでは組織型別に発現する遺伝子変異が異なることが分かっている。現時点では、非小細胞肺がん(腺がん、扁平上皮がん)に着目して検討を行う。標的とする候補遺伝子については、腺がんでは KRAS、KEAP1、STK11、SMARCA4、扁平上皮がんでは PTEN、FAT4、Notch1、NFE2L2 を対象とした。遺伝子変異に対応する CRISPR-Cas9 のガイド RNA のデザインを行った。オフターゲット効果を想定し、それぞれの遺伝子について2つずつのガイド RNA を作製した。ガイド RNA の作製については、*S. pyogenes* 由来の CRISPR-Cas9 システムをベースとして、ダブルニッキング法によりオフターゲット作用変異誘発の頻度を下げたデザインモデルを用いた。

[2. ガイド RNA の正常細胞への導入]

遺伝子編集のため作製したガイド RNA について、検討を行う細胞に導入した。導入の方法としては、物理的なアプローチとしてエレクトロポレーション法を予定していたが、プラスミドのリポフェクション法へと変更することとした。この方法も、ゲノム編集効率が高く、Cas 遺伝子が残存し、タンパク質を発現し続けることによりオフターゲット効果を最小限に抑えることができる。これらの最新の技術を活用することでより精度の高い CRISPR-Cas9 システムを活用することを目的とする。この遺伝子編集効率の向上が重要な課題と考えられ、変異導入効率の高い Cas9 及びガイド RNA の選定を重視する。

[3. 遺伝子変異を導入した細胞の安定培養、動物モデルの作製]

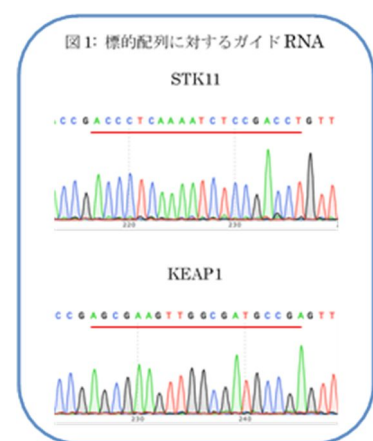
遺伝子変異を導入した細胞の安定培養を試みた。培養条件については、既報から FGF7、FGF10、BMP4、TGF- β といった因子を加え、近年 iPS 細胞から肺胞上皮細胞を培養する上で重要とされる

Wnt シグナル伝達経路促進作用を有する CHIR99021、レチノイン酸なども加える因子として検討している。複数の遺伝子変異を多段階的に導入し、さらに安定培養が確認された細胞について、実際に生体内での腫瘍形成能に変化の検討を目的として、免疫不全マウスへの移植効率を検討する。腫瘍増殖能が確認された場合、その細胞増殖性や抗がん剤を含めた化合物による影響を検討していく。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA の作製

ガイド RNA の作製にあたり、本研究の対象疾患である肺がんにおいて重要な遺伝子とされる KRAS、KEAP1、STK11、SMARCA4 (腺がん)や、PTE、FAT4、Notch1、NFE2L2 (扁平上皮がん) についてデザイン、作製をした。塩基配列の設計デザインは CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp>) を用い、各遺伝子の標的配列に対応するオリゴヌクレオチドを作製した。用いるプラスミドベクターとしては、Feng Zhang lab の pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (<https://www.addgene.org/48138/>) を使用し、Zhang lab のプロトコール (Ran FA, et al., Nat Protoc. 2013) に則りクローニングを行なった。単離された CRISPR プラスミドについて目的のガイド RNA となる配列が挿入されているかの確認のためシーケンス解析を行なった結果、適正な配列を確認した (図 1)。当初の計画通り、オフターゲット効果を想定し、それぞれの遺伝子について 2 つずつのガイド RNA を作製している。



ガイド RNA の細胞への導入と遺伝子欠損株の単離

導入方法としては、物理的なアプローチとしてエレクトロポレーション法を用いる予定であったが、導入効率についての条件検討の段階として、化学的アプローチであるトランスフェクション (段階希釈法、抗菌薬を用いたセクション)、ウイルスベクターを用いた生物学的アプローチについても検討した。その結果、化学的アプローチであるトランスフェクションが効率がよいと考えられ、この方法で実験を進行することとした。

リポフェクション試薬によるトランスフェクションを行ったのちのピューロマイシンを用いたセクションを行った。また、導入にあたって、トランスフェクション時間の差異による条件を検討するため 4, 6, 10 時間といくつかのポイントでのサンプリングを行った。時間依存的にも、細胞増殖は阻害される傾向にあり、CRISPR プラスミドの細胞増殖に与える影響がより明確に認識された。薬剤によるセクションを行った後に、シングルコロニーを採取するために希釈して 10cm 細胞培養用ディッシュに播種した。その後 7-10 日培養し、コロニーが形成された段階で顕微鏡下にコロニーピックアップを行い、シングルクローンを拾うことで遺伝子欠損細胞の単離を行った。

これらの手法を元に、そのほかの遺伝子についてもノックアウトを行い、また複数の遺伝子変異のノックアウトを同時、あるいは多段階的に行うことで細胞にどのような影響を与えていくかを評価して行く。評価方法としては、まずは細胞の増殖アッセイ、細胞増殖に変化がある場合にはその機序がアポトーシスによるものかどうかの実験、細胞の変化を、免疫染色を含めた実験で評価を行なっていき、メカニズム分析に繋げていく。最終的には多段階的に遺伝子を欠損させて発がん過程を再現することならびに動物モデルを用いた検証を今後行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山本雄介	4. 巻 1
2. 論文標題 ゲノム編集によるがん抑制因子のスクリーニング系の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 102-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki J, Ochiya T	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 Extracellular microRNAs and oxidative stress in liver injury: a systematic mini review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 6-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3164/jcbrn.17-123.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimomura Iwao, Yamamoto Yusuke, Ochiya Takahiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Synthetic Lethality in Lung Cancer?From the Perspective of Cancer Genomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicines	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/medicines6010038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Juntaro Matsuzaki, Shunsuke Kondo, Minoru Esaki, Takuji Okusaka, Kazuaki Shimada, Ken Kato, Yoshiaki Aoki, Makiko Ichikawa, Satoko Takizawa, Hiromi Sakamoto, Shumpei Niida, Fumitaka Takeshita, and Takahiro Ochiya
2. 発表標題 Serum microRNAs for the early-stage detection of hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia “Liver Biology, Diseases &Cancer”（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔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
研究 分担 者	松崎 潤太郎 (Matsuzaki Juntaro) (60464864)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員 (82606)	