

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07317

研究課題名(和文) ゲノム編集を用いたEva1陽性グリオーマ幹細胞の増殖抑制ベクターの開発

研究課題名(英文) Development of growth inhibitory vectors for Eva1-positive glioma stem cells using genome editing

研究代表者

大津 直樹 (Ohtsu, Naoki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：10588403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ(GBM)においてEva1陽性細胞が再発の原因となるグリオーマ幹細胞であることを示唆していた。本研究ではEva1陽性細胞の増殖を選択的に抑制させるため、ゲノム編集を用いてEva1遺伝子プロモーター下流にp53遺伝子を挿入することを試みた。レポーター遺伝子(mK01)が挿入された細胞は検出できたが、mK01とともにp53を挿入した場合、mK01陽性細胞は検出できなかった。このことからEva1陽性細胞でp53が発現し、増殖が抑制されたことが示唆された。しかしノックイン効率は低いため、今後定量解析できる程度に効率を高めることが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Crispr/Cas9を用いたゲノム編集が近年開発されたため、これまでになかった難治疾患に対する遺伝治療方法の開発が期待されている。ゲノム編集を用いることで、あらゆる遺伝子変性疾患のモデルマウスや疾患細胞が作成され、それを用いた治療方法の開発が加速している。本研究においてもゲノム編集を用いて神経幹細胞から悪性脳腫瘍を作り出すことができ、またゲノム編集を用いてEva1陽性細胞を抑制することができたならば、悪性腫瘍治療方法開発のモデルケースになると考えられる。100歳まで健康不安なく、人生を楽しめる社会形成の一端を担っている研究である。

研究成果の概要(英文)：We have previously suggested that Eva1-positive cells are glioblastoma stem cells that cause recurrence in the malignant brain tumor glioblastoma (GBM). In this study, we attempted to insert the p53 gene downstream of the Eva1 gene promoter using genome editing in order to selectively suppress the proliferation of Eva1-positive cells. Cells in which the reporter gene (mK01) was inserted could be detected, but mK01-positive cells could not be detected when p53 was inserted together with mK01. This suggests that p53 was expressed in Eva1-positive cells and their proliferation was suppressed. However, since the knock-in efficiency is low, it is necessary to increase the efficiency to the extent that it can be quantitatively analyzed in the future.

研究分野：ガンの治療方法の開発

キーワード：グリオブラストーマ グリオーマ幹細胞 人工グリオーマ幹細胞 ゲノム編集 遺伝子治療 p53 Eva1

## 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍においても腫瘍摘出技術の向上・放射線技術の向上・新規薬剤のスクリーニング及び免疫療法の開発が進歩し、低グレード脳腫瘍に関しては飛躍的な生存率の向上がみられている。しかし、**WHO grade IV** でありながら発生頻度が高い膠芽腫 (**glioblastoma multiforme; GBM**) に関しては、再発率が未だ高く 5 年生存率は **10%** 以下である。治療方法を確立できない原因として **GBM** の中に増殖能、抗ガン剤耐性、及び放射線照射耐性が高いガン幹細胞的な細胞集団が存在することや、浸潤能があり外科的手術で全摘出できないことがある。このため新規の治療方法の開発が切望されている。

我々がグリオーマ幹細胞 (**Glioma-initiating cell: GIC**) から単離してきた膜タンパク質 **Eva1** は、ヒトの正常脳組織では発現しないが、グリオーマでは発現し、特に **GBM** においては特に強く発現することが認められていた。また、**Eva1** の強制発現は低グレードグリオーマの悪性度を亢進させたため、**Eva1** の発現が **GBM** の発生に重要であると考えられていた。

近年発展しているゲノム編集技術は **Crispr/Cas9** を用いることで容易に行えるようになり、難治疾患に対してもこれまでになかった新たな治療方法の開発が期待されている。疾患の治療に対してゲノム編集技術を用いるためには、正常細胞には影響なく目的の変異細胞のみに効果をもたらす仕組みを担うゲノム編集 **vector** の開発が課題であった。

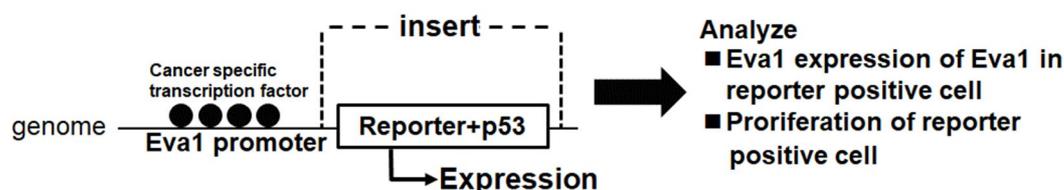
## 2. 研究の目的

遺伝子治療においては正常細胞には影響なく目的の変異細胞のみに効果をもたらす仕組みを作る必要がある。本研究では研究開始当初の背景のように、**Eva1** 遺伝子が正常脳細胞に発現せず、**GIC** に強く発現することから、**Eva1** 遺伝子プロモーターが脳内におけるゲノム編集システムの作動もしくは停止のスイッチとなる可能性があった。そこで **GIC** における **Eva1** 遺伝子の発現依存的なゲノム編集システムの動作を検証することを目的とした。**GIC** 以外のガン腫に対しても、**Eva1** が発現していれば **Eva1** 遺伝子の発現依存的な細胞増殖抑制もしくは生存活性の抑制を検証する。

## 3. 研究の方法

**Crispr/Cas9** を用いたゲノム編集技術を用いれば **GIC** 特異的遺伝子である **Eva1** のプロモーター領域下流にレポーター遺伝子を挿入すれば、**Eva1** 陽性 **GIC** を識別することができ、また **p53** などの増殖抑制遺伝子を挿入すれば **GIC** の増殖を抑制できると考えられた(下図)。実験では **Eva1** 陽性の細胞としてヒト乳ガン細胞株及びマウス **GIC** を用い、**Eva1** 陰性細胞として **HEK293** 細胞を用いた。**Eva1** プロモーターの下流配列を認識する **guide RNA (gRNA)** をヒト及びマウスで作成した。ヒトに関してはレポーター遺伝子である **GFP** とともに **p53** を挿入させる **Donor vector** 作成した。マウスに関してはマウス **GIC** が **GFP** を発現しているためレポーターとして **monomeric Kusabira Orange1 (mKO1)** を用いて **Donor vector** を作成した。作成したゲノム編集 **vector** をそれぞれの細胞にエレクトロポレーションで **gRNA** とともに **Donor vector** を導入し、レポーター遺伝子の発現と細胞の増殖や生存活性に関して解析を行った。

### Genome editing of GIC



ゲノム編集実験のイメージ図

## 4. 研究成果

まずポジティブコントロールとしてほぼ 100% **Eva1** 陽性であるヒト乳ガン細胞株の一つ **MCF7** を用いてゲノム編集を行った。Human **Eva1** (**hEva1**) プロモーター下流に設計した **gRNA** とともにホモロジーアーム (**HA**) の間に **GFP** 遺伝子を挟んだ **Donor vector** を細胞に導入した(図 1A)。Genotyping を行うと **Donor vector** だけ導入してもゲノムへの挿入は認められないが、**hEva1** 遺伝子のプロモーターの下流の配列で設計した **gRNA** 発現 **vector** とともに導入するとゲノムへの遺伝子の挿入が認められた(図 1B)。顕微鏡で観察すると **Eva1** 遺伝子を発現している **MCF7** では **GFP** の発現が認められたが、ネガティブコントロールとして用いた **Eva1** を発現していない **HEK293** 細胞では **GFP** の発現が認められなかった(図 1C)。このことからヒト細胞においてゲノム編集を行い **Eva1** プロモーター下流に挿入された **GFP** 遺伝子の発現は、**Eva1** 遺伝子プロモーターの制御に従うことが明らかになった。

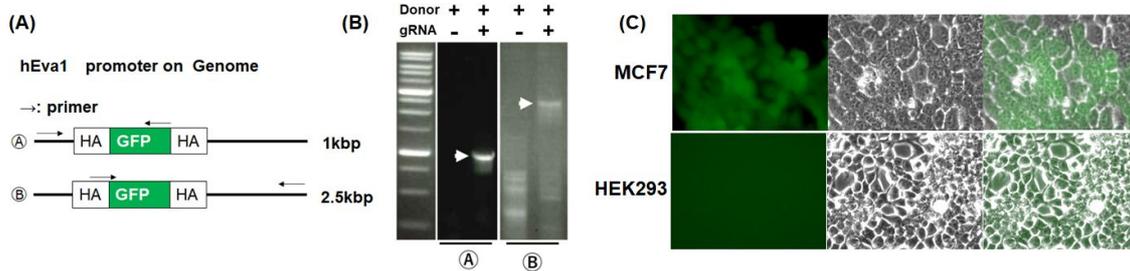


図1 A. Genotyping PCR に使用した GFP とゲノムを認識する Primer。 hEva1 遺伝子の転写開始点の下流に gRNA を設計し、そこに GFP が挿入されるように HA を設計した。B. MCF7 の Genome PCR 後の電気泳動像。C. ゲノム編集 vector を導入した MCF7 と HEK293 の蛍光顕微鏡で観察した図。

次に Eva1 プロモーターの下流に GFP とともに p53 を挿入した(図 2A)。MCF7 に p53 遺伝子を強制発現させると細胞の増殖抑制やアポトーシスを誘導できていた。ゲノム編集を用いて p53 をゲノムに挿入した際も GFP 陽性細胞率は GFP だけを挿入した場合と比較して減少が認められた(図 2B)。また p53 を挿入した場合は生存活性の減少が認められた(図 2C)。このことから作成したゲノム編集 vector は Eva1 遺伝子の発現に従い細胞の増殖を抑制させることができることが示唆された。

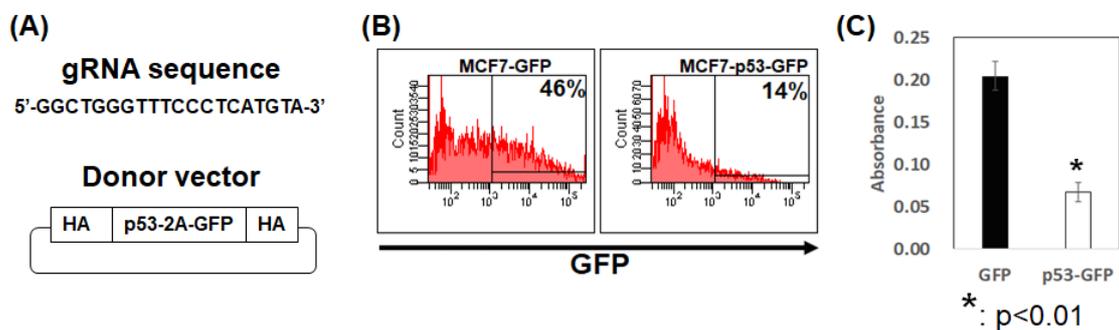


図2 A. 実験に用いた gRNA の配列と Donor vector の模式図 HA は 500bp B. p53 をゲノムに挿入した場合の GFP 陽性率を FACS で解析した図 C. p53 をゲノムに挿入した場合の生存活性を MTT assay で解析した図

同様にマウス GIC に対してもゲノム編集を行った。マウスのゲノム配列を基にした gRNA と Donor vector を作成した(図 2A)。マウスでも Genotyping を行うと、mEva1 プロモーターの下流に mKO1 が挿入されたことを確認できた(図 2B)。mKO1 の発現を qPCR で確認した。Donor vector だけ導入した場合はほぼ mKO1 の発現は認められなかったが、gRNA とともに Donor vector を導入すると mKO1 の発現が認められた(図 2C)。gRNA とともに Donor vector を導入した細胞において mKO1 の発現と Eva1 の発現の相関も解析した。FACS を用いて mKO1 陽性 GIC、及び mKO1 陰性 GIC のそれぞれを分取し Eva1 の発現を qPCR で解析すると、mKO1 陽性細胞の方が強く Eva1 が発現していることが明らかになった(図 2C)。このことから GIC に対してもゲノム編集を用いてプロモーターの下流に遺伝子を挿入することができ、挿入された遺伝子の発現はプロモーターの制御によることが認められた。またこのゲノム編集 vector はグリオーマにおいて Eva1 陽性細胞と陰性細胞を区別することができることが明らかになった。

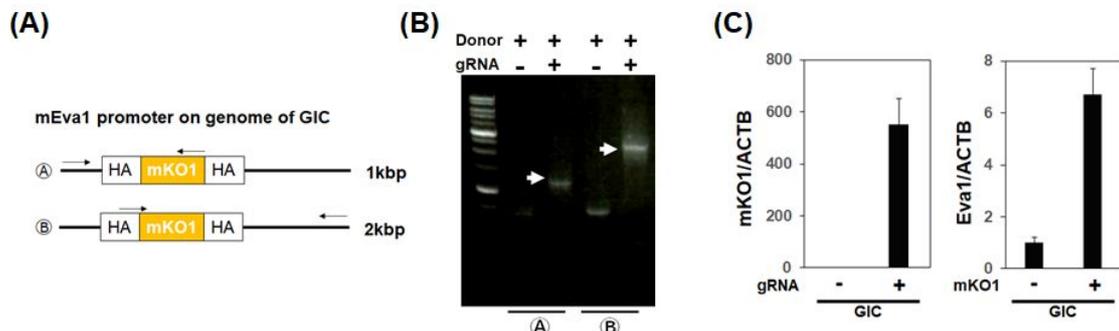


図3 A. Genotyping PCR に使用した mKO1 とゲノムを認識する Primer。 mEva1 遺伝子の転写開始点の下流に gRNA を設計し、そこに mKO1 が挿入されるように HA を設計した。B. Genotyping PCR 後の電気泳動像。C. ゲノム編集 vector を導入した mGIC における

最後に GIC の Eva1 プロモーターの下流に mKO1 とともに p53 を挿入した(図 4A)。mKO1 だけを挿入された GIC においては mKO1 陽性細胞を監察することができたが、mKO1 とともに p53 を挿入した場合には mKO1 陽性細胞は検出できなかった。このことから Eva1 陽性細胞は p53 により増

殖が抑制されたことが示唆された。

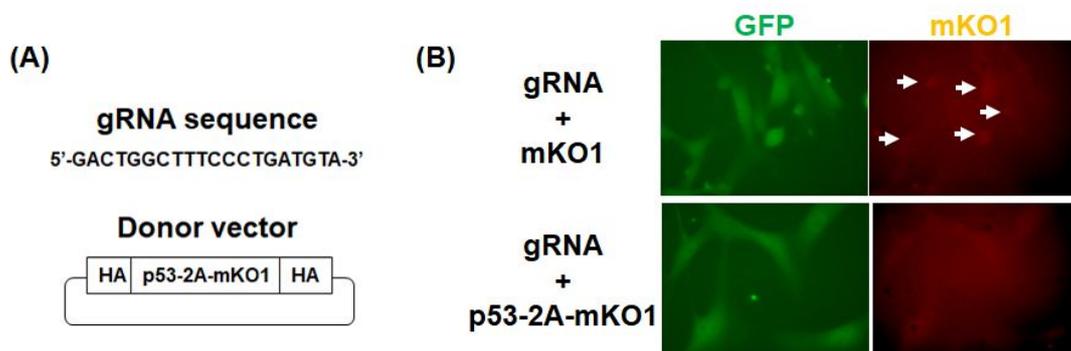


図4 A. 実験に用いた gRNA の配列と Donor vector の模式図 HA は 500bp B. p53 をゲノムに挿入した場合の mKO1 陽性細胞を蛍光顕微鏡で観察した。矢印は mKO1 陽性細胞

本研究により Eva1 遺伝子プロモーターの下流に遺伝子を挿入するとプロモーターの制御に従い p53 が発現し、GIC に細胞増殖抑制遺伝子を挿入させると Eva1 陽性細胞のみ増殖が抑制されることが示唆明らかになった。正常脳細胞には発現せず、悪性脳腫瘍である GBM で強く発現する遺伝子を使えば、GBM 特異的遺伝子プロモーターをドライバーとする GBM の抑制という新たな遺伝子治療法を提案できる可能性がある。今回の実験ではヒト乳ガン細胞である MCF7 においては Eva1 の発現に従い増殖を抑制するという発見があったため、他のガン腫でも Eva1 がドライバーとなり得ることも示唆された。今後の課題としては、GIC に関しては遺伝子組み換え効率が数%で低いという問題点がある。GIC においてはレポーター遺伝子とともに p53 遺伝子を挿入した場合は mKO1 陽性細胞が検出できず、本当にゲノムが挿入されたことが原因であることが確認できていない。本当にこのゲノム編集が GIC の腫瘍形成を抑制することを明らかにするために皮下及び脳内に形成させた腫瘍に対して、アデノ随伴ウイルス vector を用いて Donor 配列と gRNA を導入して腫瘍抑制効果を検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を介したグリオーマ幹細胞の誘導
3. 学会等名 細胞を作る会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたグリオーマ幹細胞の樹立及びEva1陽性細胞の検出と増殖抑制
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたグリオーマ幹細胞の樹立と浸潤について
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたグリオーマ幹細胞の樹立と浸潤能について
3. 学会等名 北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたEva1+細胞の増殖抑制方法の開発
3. 学会等名 北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたEva1陽性細胞の検出と抑制
3. 学会等名 北海道大学IGM交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津直樹、近藤亨
2. 発表標題 神経幹細胞がグリオーマ幹細胞に変化するプロセスにおけるEva1遺伝子の発現モニタリング
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------