

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11090

研究課題名(和文) p63がもつ口腔癌の悪性転化抑制能をゲノム編集により解析する

研究課題名(英文) Genome editing for p63 in a head-and-neck squamous carcinoma cell line

研究代表者

倉田 俊一 (Kurata, Shun-ichi)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：60140901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：P63(TP63)はがん抑制遺伝子p53ファミリーの一つで、非浸潤性の頭頸部扁平上皮癌で高レベルに発現する。p63の機能を調べるためにCRISPR-Cas9法によるゲノム編集を試みた。p63にはTA型とN型の二つの転写開始点があり、本研究ではTA型の第一エクソンのノックアウトを行った。ガイドRNAとCas9を持つ「ガイドベクター」と切断部位の5'側および3'側の隣接配列の間に薬剤耐性遺伝子を持つ「ドナーベクター」を口腔癌細胞株に導入し、薬剤耐性細胞を選択した。2種類の薬剤耐性ドナーベクターを2段階で導入・選択することにより両アレル性のTA-p63ノックアウト細胞が得られた。

研究成果の概要(英文)：P63(TP63), one of the tumor suppressor p53 gene family, is highly expressed in non-invasive squamous carcinomas of head-and-neck. To investigate the role of p63, we attempted genome editing with CRISPR-Cas9. P63 has TA and N type transcription start sites, of which we focused on the first exon of TA-p63. We selected drug-resistant cells after transfection of carcinoma cells with a guide vector containing the gRNA and Cas9 together with a donor vector containing a drug-resistance gene between the 5' and 3' flanking regions of the target site. This procedure allowed recombination at the expected site, but only at a single allele. To achieve the biallelic knockout, we needed to perform step-wise transfection-and-selection cycles using two donor vectors with different drug resistance genes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：p63 CRISPR-Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

(1) p63(TP63)は癌抑制遺伝子 p53 ファミリーのひとつで、高分化型の頭頸部扁平上皮癌で高発現し、細胞の分化能の維持に不可欠であると考えられている。p63 の発現が消失すると、癌の悪性転化が起こるが、その分子機構は不明であった。

(2) p63 遺伝子には 2 つの転写開始点が存在し、TA(transactivation)型と $\Delta$ N(N 末端欠失)型の RNA として発現し、さらにスプライシングにより $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ などのアイソフォームが生じる。TA-p63 は転写活性化能や DNA 損傷応答性など p53 のがん抑制作用と共通の性質を示す。一方、 $\Delta$ N-p63 は当初、p53 や TA-p63 を抑制するドミナントネガティブ型として報告されたが、 $\Delta$ N-p63 が転写活性化能を有するという報告もあった。癌細胞における TA-p63 と $\Delta$ N-p63 の役割は、ノックアウトマウスや siRNA 法では解決できず、新しい技術が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

本研究では p63 の TA 型の第 1 エキソンを標的にして、CRISPR-Cas9 法によるゲノム編集を行った。翻訳開始コドンの変異体を選択する方法が一般的であるが、その場合、第 2 の AUG コドンから N 末端の異なるタンパク質合成が起こる。p63 のように様々なアイソフォームを生じる遺伝子の場合、第一エキソン(転写開始部)をノックアウトする必要があった。[標的配列ガイド RNA]と[Cas9]をコードする「ガイドベクター」および[切断部位の 5' 側隣接配列]-[薬剤耐性遺伝子カセット]-[3' 側の隣接配列]の構造を持つ「ドナーベクター」を用いて、TA-p63 の第 1 エキシソンのノックアウトを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) Cas9 酵素とともに guide RNA (gRNA)を発現するように構成されたプラスミド(Guide vector)である pCas-Guide (Origene 社)を用いた。標的配列として

GTCAGGGCAGTACTGTAGGG が挿入された KN208013G1(以下 G1 と略す)および標的配列 AAACCTCACCGCTGGATGTAA が挿入された KN208013G2(G2)を試みた。染色体 DNA 切断部位で組換えを行うため、LHA-GFP- Puro<sup>R</sup>-RHA (LHA, Left-hand arm; RHA, Right-hand arm) の構造を有するドナーベクターを用いた。このドナーベクター(ドナーベクター Puro<sup>R</sup>)は切断部位から LHA(左手アーム)および RHA(右手アーム)としてそれぞれ 600 bp のゲノム配列が存在し、その中央にマウス PGK プロモータにより Puromycin 耐性遺伝子(Puro<sup>R</sup>)が発現するカセットを持つため、遺伝子編集細胞をピューロマイシン耐性によって選択した。

(2) ガイドベクターとドナーベクターを FaDu 細胞に導入後、エピソームとして存在するプラスミドをできるだけ除去するため 1:10 希釈で 5 代以上の継代培養を行った。ピューロマイシンを含む培地で耐性細胞を選択後、最初は細胞集団として解析し、次に限界希釈法により 10 細胞株を得た。ピューロマイシンは標準 100 ng/mL を用いたが、実験によっては濃度を变化させた。必要に応じてさらに細胞の単離を行い、各株から 15 のサブクローンを得た。

(3) 薬剤耐性の株化細胞からゲノム DNA を精製し、PCR を実施した。ゲノム DNA の精製にはシリカ・メンブレン法(NucleoSpin Tissue, Machery-Nagel)を用いた。LHA 配列、その 5' 側のゲノム配列、Puro<sup>R</sup> カセット配列、RHA 配列、その 3' 側のゲノム配列にそれぞれ Forward および Reverse プライマーを設計し(図 1)、PCR 反応を行った。

(4) ネオマイシン耐性遺伝子を持つドナーベクター-Neo<sup>R</sup>を作成した。pCMV6-3DDK-AC プラスミドを鋳型にし、XhoI および NsiI 末端配列を付加したプライマーを用いて Neo<sup>R</sup> 配列を増幅し、XhoI-NsiI 断片とした。親プラスミドの Puro<sup>R</sup> 配列を XhoI と NsiI で除去し、

Neo<sup>R</sup>を挿入した。ネオマイシン遺伝子導入細胞は G418 (100μg/mL) で選択した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞としては中咽頭扁平上皮癌に由来する FaDu 株を用いた。頭頸部扁平上皮癌では TP63 遺伝子領域が高頻度に増幅されているが、FaDu 細胞は TP63 が染色体 DNA あたり 1 コピーであることを確認し、ゲノム編集に適切と判断した。

(2) ガイドベクター G2 とドナーベクター Puro<sup>R</sup> の組み合わせで得られたピューロマイシン耐性細胞集団に関して、A-C のプライマー (図 1) で PCR を実施したところ高率に組換えが検出された。G1 とドナーベクターの組み合わせではその頻度が G2 の 10% 以下であった。以後、ガイドベクターとしては主に G2

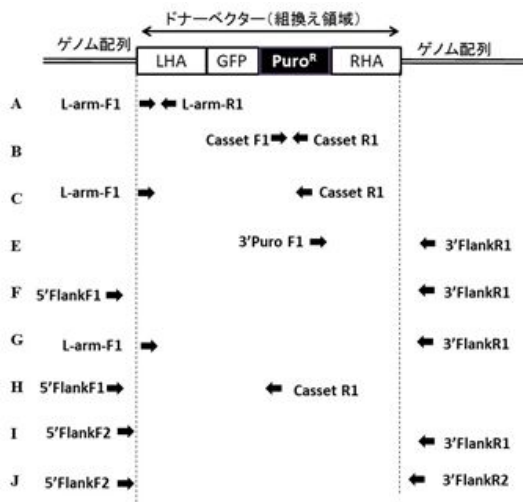


図1. ドナーベクターの構造とゲノム編集の検出に用いたPCRプライマー・ペア (A-J)

を用いた。

(2) ピューロマイシン耐性の細胞集団から、まず 10 の細胞株を得た。ゲノム DNA を精製して PCR を実施した結果、ドナーベクターの配列があること (プライマー A-C)、その 5' 側および 3' 側のゲノム配列とドナーベクター配列が正しい位置関係にあること (E, G, H) を確認した。

(3) しかし、プライマー・ペア F, I, J で増幅すると、選択した 10 のすべての細胞株で組換えが起こっていない元のゲノム配列が検出された。これらの結果から (i) すべて

のクローンが片アレル性 (monoallelic) のノックアウトである、(ii) まだ混合細胞の状態であり、細胞が単離されていない、の 2 つの可能性が考えられた。これを調べるために、10 株のうち 2 つについてそれぞれ 15 個のサブクローンを得た。最終的に、得られたすべての細胞クローンは片アレルで編集が成功し、TA-p63 はノックアウトされているが、もう一方の正常アレルは残っていると判断した。

(4) 両アレル性 (biallelic) のゲノム編集細胞を得るため次のような方法を試みた。2 倍量の DNA を導入し、耐性細胞を選択した。

高濃度のピューロマイシンを使用した。片アレル性の TA-p63 編集細胞に再度ガイドベクターとドナーベクターを導入し、Puro<sup>R</sup> 細胞を選択した。この方法で約 30 の細胞クローンを得たが、両アレル性のノックアウト細胞は含まれていなかった。

(5) ドナーベクター Neo<sup>R</sup> を作成し、G418 による選択を試みた。上述の片アレル p63 ノックアウト Puro<sup>R</sup> 細胞への再度のトランスフェクションを行い、ピューロマイシンと G418 の 2 つの薬剤で耐性細胞を選択した。限界希釈法で 10 の細胞株を得た。ゲノム DNA を PCR で解析したところ、4 クローンで p63 の第一エキソンで両アレルが組換えを起こしていた。また、一方は Puro<sup>R</sup>、他方は Neo<sup>R</sup> カセットを持っていた。このように、2 種類の薬剤耐性ドナーベクターを 2 段階で導入・選択することにより両アレル性の TA-p63 ノックアウト細胞が得られた。

#### (6) TA-p63 タンパク質の解析

TA 型 p63 の発現は ΔN 型 p63 に比較して低く、さらに TA-p63 タンパク質の半減期が短く、検出が難しい。DNA 損傷により TA-p63 は蓄積するので、対照の FaDu 細胞および TA-p63 ノックアウト細胞に UV 照射を施し、p63 タンパク質を Western Blotting で解析した。FaDu 親株では蓄積された TA-p63 が検出されたが、

ノックアウト細胞では検出されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Maeda T, Suzuki A, Koga K, Miyamoto C, Maehata Y, Ozawa S, Ikoma T, Hata R-I, Nagashima Y, Nabeshima K, Miyazaki K, Kato Y.

TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells.

Oncotarget, 8(45): 78312-78326, 2017  
査読有

Kondo T, Ozawa S, Ikoma T1, Yang XY, Kanamori K, Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y, Miyamoto C, Taguchi T, Kiyono T, Kubota E, Hata RI.

Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogenesis, 5(7):e240, 2016 査読有

Xiao-Yan Yang, Chihiro Miyamoto, Tetsu Akasaka, Kazuhito Izukuri, Yojiro Maehata, Takeharu Ikoma, Shigeyuki Ozawa, Ryu-Ichiro Hata

Chemokine CXCL14 is a multistep tumor suppressor.

Journal of Oral Biosciences 58:16-22, 2016 査読無

Katoh I, Fukunishi N, Fujimuro M, Kasai H, Moriishi K, Hata R, Kurata S.

Repression of Wnt/  $\beta$ -catenin response elements by p63 (TP63).

Cell Cycle 2:699-710, 2016 査読有

[学会発表](計 8 件)

Interplay between p63(TP63) and adenovirus oncoproteins over the Wnt/

$\beta$ -catenin target sequences.

加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一

第 76 回日本癌学会 学術総会, 2017

Xiaoyan Y, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Kanamori K, Kiyono T, Hata R-I: Chemokine CXCL14 is a multifunctional guardian molecule: A promising molecular target for cancer therapy and prevention.

第 76 回日本癌学会, 2017

p63(TP63), a p53 family protein, cross-interacts with adenovirus oncoproteins in Wnt/  $\beta$ -catenin-directed transcriptional control

倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子

第 90 回日本生化学会大会, 2017

加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一

Repression of Wnt target genes by p63

第 75 回日本癌学会学術総会 2016

倉田俊一, 畑隆一郎, 加藤伊陽子

p63 とヒストンアセチル基転移酵素 p300 及び アデノウイルス E1a の相互作用

第 89 回日本生化学会 2016

倉田俊一, 福西 菜穂子, 藤室 雅弘, 畑隆一郎, 加藤伊陽子

p63(TP63)は TCF/  $\beta$ -カテニンによる遺伝子発現誘導を制御する

第 88 回日本生化学会大会 2015

加藤伊陽子, 畑隆一郎, 倉田俊一

Repression of Wnt target genes by p63

第 74 回日本癌学会学術総会 2015

Hata R-I, Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K, Iwabuchi I, Maehata Y, Miyamoto C, Yang X-Y, Kubota R. Expression of the chemokine CXCL14 is a predictive biomarker for Cetuximab-dependent tumor suppression. 1st Nature Immunology - Cellular & Molecular Immunology Joint Conference, 2015.

[その他]

<http://www.labs.kdu.ac.jp/hightech/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

倉田 俊一 (KURATA, Shun-ichi)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・特任教授  
研究者番号：60140901

(2)連携研究者

畑 隆一郎 (HATA, Ryu-Ichiro)  
神奈川県立歯科大学・歯学部・特任教授  
研究者番号：10014276

加藤 伊陽子 (KATOH, Iyoko)  
山梨大学・総合研究部・准教授  
研究者番号：20333297