

令和元年6月6日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14618

研究課題名(和文)がん細胞の生存に必須な遺伝子を探索する

研究課題名(英文)The search for genes that essential for cancer cell survival.

研究代表者

青木 勝彦(AOKI, Katsuhiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80328278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の生存に必須な遺伝子を探索するための新たなスクリーニング方法を確立した。まず、がん細胞に対して網羅的な遺伝子破壊を行った集団を用意し、その集団に対して抗がん剤を処理した。このとき、抗がん剤耐性に関与している遺伝子が破壊されている細胞では細胞死が誘導される。次に、死んだ細胞を回収し、そのDNAを解析することで抗がん剤耐性に関与する遺伝子の候補を選び出した。選択された4種類の遺伝子発現を抑制し、抗がん剤に対する感受性を調べたところ、そのうちの3種類は抗がん剤に対して脆弱になっていた。以上より、本研究で確立されたスクリーニング法の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞はその進展や治療の過程で環境に適応し、悪性度を高めることが知られている。本研究で確立したスクリーニング法は、抗がん剤耐性を獲得したがん細胞に対する新たな治療標的分子の探索に利用できるだけでなく、低酸素や低栄養などの特定の環境に適応したがん細胞に対しても利用が可能であると考えられる。本研究のスクリーニング法によって得られる情報は、その環境での生存に必須な遺伝子の同定につながり、そのような遺伝子の機能を理解することで、がん細胞の環境適応機構の解明や環境適応機構を逆手に取った治療標的分子の探索が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A new screening method was developed to search for genes that essential for the survival of cancer cells. First, a population in which cancer cells were subjected to comprehensive gene disruption was prepared, and the population was treated with an anticancer drug. At this time, cell death is induced in cancer cells in which a gene involved in anticancer drug resistance is destroyed. Next, dead cells were recovered, and their DNAs were analyzed to select candidate genes involved in resistance to anticancer drugs. When the expression of four selected genes was suppressed and the sensitivity to the anticancer drug was examined, three of them were vulnerable to the anticancer drug. From the above, the usefulness of the screening method established in this study was suggested.

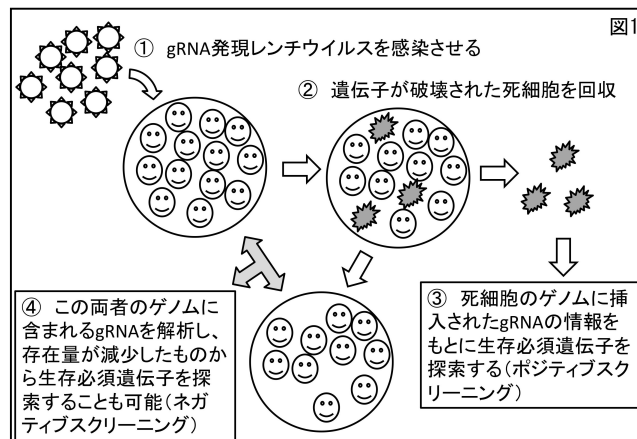
研究分野：分子生物学

キーワード：がん ゲノム編集

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

1. 研究開始当初の背景

従来のがん研究では、がん細胞に特徴的な遺伝子の変異や発現の変化に着目し、そこから選出された遺伝子産物について解析を進めることで、治療標的として有望か否かを判断する。ところがこのようにして解析を始めた新規の遺伝子産物は、がん細胞の生存や増殖と無関係であることが多く、その場合には新たな候補に対して繰り返し解析を行わなければならない。この傾向は、近年のがんゲノム解析や網羅的な発現解析の爆発的な進展によってさらに加速されると考えられ、がん治療の分子標的候補を効率よく探索するための新たな方法論を開発することが必要とされていた。一方、ゲノム編集技術の進展によってがん細胞株の遺伝子を網羅的に破壊することが可能になり、それまで不明であったがん細胞の増殖や生存に必須な遺伝子群(現在ではフィットネス遺伝子と呼ばれている)の探索結果が散見されるようになっていた(1, 2, 3)。このゲノム編集を利用した実験系は、がん細胞の生存に必死な遺伝子の探索に有用であり、その知見をもとにして新たな治療標的候補を発見することが可能であると考えられる。しかしながら、研究開始当初から現在に至るまで、フィットネス遺伝子の探索は細胞の集団からの減少率を指標として行われている。すなわち、ゲノム編集の結果として細胞の生存に必須な遺伝子が破壊された場合、その細胞は集団内から消失するはずであり、細胞集団内における減少の程度を継時的に追跡することでフィットネス遺伝子を同定しているのである。この方法は大規模な配列データを比較するネガティブスクリーニングに相当するため、情報処理を専門としない研究者が行うには困難が伴うと考えられる。そこで本研究では、取り扱うデータ量を減少させることが可能なポジティブスクリーニングによるフィットネス遺伝子の探索が可能な実験系を立案し、その確立を目指した。その概要を図1に示す。本研究は挑戦的萌芽研究として採択されたが、そのチャレンジ性は、死細胞由来のDNAを解析対象とすることにあつた。ゲノム編集による遺伝子破壊によって死んだ細胞を解析対象にすることが可能であれば、従来のスクリーニング法よりも直接的にがん細胞の生存必須遺伝子を探索することができると考えられる。細胞が死んだ場合、そのゲノムDNAは切断されてバラバラになってしまうが、そのようなDNA断片でも次世代シーケンサー(NGS)を用いることで解読が可能であることは血漿中のセルフフリーDNAの解析などで示されていた。



減少させることが可能なポジティブスクリーニングによるフィットネス遺伝子の探索が可能な実験系を立案し、その確立を目指した。その概要を図1に示す。本研究は挑戦的萌芽研究として採択されたが、そのチャレンジ性は、死細胞由来のDNAを解析対象とすることにあつた。ゲノム編集による遺伝子破壊によって死んだ細胞を解析対象にすることが可能であれば、従来のスクリーニング法よりも直接的にがん細胞の生存必須遺伝子を探索することができると考えられる。細胞が死んだ場合、そのゲノムDNAは切断されてバラバラになってしまうが、そのようなDNA断片でも次世代シーケンサー(NGS)を用いることで解読が可能であることは血漿中のセルフフリーDNAの解析などで示されていた。

2. 研究の目的

がん細胞の生存に必須な遺伝子の探索をポジティブスクリーニングによって行うには、ゲノム編集による遺伝子破壊の結果として死んだ細胞を研究試料とすれば良い。そこで、まず死細胞由来のゲノムDNAの精製法を確立することを目指した。つぎに、精製した死細胞由来のDNAをNGSで解析することにより、がん細胞の生存に必須な遺伝子を同定することを目指した。同定された遺伝子群は、その機能阻害によってがん細胞を死に導く分子であるため、新たな治療薬の開発に直結する分子標的候補であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) プラスミドベクターの入手とレンチウイルスベクターの作製

ゲノム編集用のライブラリー(Human CRISPR Knockout Pooled Library, GeCKO v2)およびその他のプラスミドはAddgeneより入手した。このライブラリー(Addgene #1000000049)にはgRNA導入用ベクター(gRNA pooled library in lentiGuide-Puro)とCas9発現用ベクター(lentiCas9-Blast)が含まれており、ヒトの各遺伝子につき6種類のgRNAが用意されている。miRNAを標的とするgRNAを含めて、122,411種類のgRNAを含むライブラリーである。まず、このgRNAライブラリーをエレクトロポレーションによって大腸菌に導入し、レンチウイルスベクター作製のプラスミドを精製した。大腸菌のコロニー形成数から換算すると、得られたプラスミドは1種類のgRNAに対して3000倍以上に増幅されているため、ライブラリーの多様性は確保できていると考えられる。増幅させたライブラリーとウイルスパッケージング用のベクター(psPAX2: Addgene #12260, pMD2.G: #12259)を293T細胞へポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションし、その培養上清を回収した。1回のトランスフェクションに使用したライブラリー-DNA量は8 μ gである。回収した培養上清を濃縮した後、そこに含まれるレンチウイルスベクターのタイターを定量PCR法で見積もったところ、約 6×10^7 IU/mLであった。gRNAライブラリーウイルス粒子は実験に使用するまで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

(2) Cas9発現細胞の作製

lentiCas9-Blast と psPAX2、pMD2.G を用いて Cas9 発現用のレンチウイルスベクターを製した。これをアドリマイシン耐性卵巣癌細胞株 A2780ADR に感染させ、ブラストサイジン S 存在下で形成されたコロニーを複数単離し、それらのクローンにおける Cas9 タンパク質の発現量をイムノブロットングで評価した。Cas9 が最も高発現していたクローンを試料として用いた。なお、このクローンについては細胞認証試験を行い、A2780ADR 由来であることを確認している。

(3) Cas9 発現細胞への gRNA ライブラリーの導入と死細胞の回収

Cas9 発現細胞を DMEM (2% FBS) で培養し、 3×10^7 細胞に対して 3×10^7 ICU の gRNA ライブラリーウイルスを感染させた (MOI は 1 以下)。gRNA を導入した細胞はピューロマイシンで選択を行いつつ、スケールを維持しながら 2 週間継代した。その後、アドリマイシンを $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、翌日から培養上清に遊離した死細胞を遠心分離で回収した。なお、同時にアドリマイシン非添加群も用意し、同様に培養上清に遊離している細胞を回収した。このアドリマイシン非添加群で回収された細胞はアドリマイシン添加群の死細胞に対するコントロールとして解析に用いた。

(4) 死細胞からの DNA の精製と gRNA 配列の増幅・精製

回収した死細胞を尿素と SDS をベースとしたゲノム DNA 抽出溶液で溶解し、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱によって精製した。精製した DNA を定量し、死細胞の DNA に挿入されているベクター由来の gRNA 配列を、Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method) 法 (Thermo Fisher Scientific 社) を改変した方法で増幅させた。得られた PCR 産物に対して SPRIselect (Beckman Coulter 社) でサイズセレクションを行い、200bp の PCR 産物を得た。

(5) NGS による解析

精製した PCR 産物の濃度をバイオアナライザー (Agilent DNA 1000 Kit) で検定し、Ion PGM (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて試料に含まれる配列を解読した。使用したチップは Ion 314 Chip v2 である。Fusion Method で増幅した PCR 産物にはバーコード配列が融合されているため、複数の試料を同時に解読可能である。公開されているライブラリーの gRNA 配列情報を参照することで、解読された配列 (リード) と遺伝子とを対応させた。集計後、試料間の比較のために、全ての gRNA 配列に対して偽リードとして 1 を加え、解析用のデータとした。

(6) 候補遺伝子の評価

コントロールのアドリマイシン非処理で得られた遺伝子のリード数とアドリマイシン処理の死細胞から得られた遺伝子のリード数を比較した場合、死細胞で増えていたものはアドリマイシン耐性に関与する遺伝子である可能性が高い。そこで、死細胞で増えていたもののうち、上位の 4 種類を候補遺伝子として解析対象とした。それぞれの遺伝子に対して 2 種類の siRNA を用意し、ノックダウン実験を行った。siRNA を A2780ADR 細胞に導入し、3 日後にアドリマイシン (終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。その後、MTS アッセイにより細胞毒性を評価した。

4 . 研究成果

(1) 死細胞由来 DNA の精製法の確立

まず、モデル実験系を構築し、それを利用して死細胞由来の DNA を精製することを試みた。卵巣癌細胞株 A2780 に GFP をレンチウイルスベクターで導入することで A2780GFP 細胞を樹立した。この A2780GFP 細胞をアドリマイシン耐性の A2780ADR 細胞と共培養した状態でアドリマイシンを添加し、A2780GFP に細胞死を誘導した。このモデル実験系では、A2780ADR と共培養する A2780GFP の数を変えることで、実際のライブラリースケールの実験を想定した条件検討が可能である。アドリマイシンを添加した共培養系から培養上清 (死細胞を含む) を回収し、それに含まれる DNA の精製方法を検討した。本研究の立案段階では培養上清中のセルフリー DNA も解析対象としていたため、10% の血清を含む培養上清から DNA の精製を試みた。その結果、スモールスケールの実験系においては DNA の精製は可能であり、培養上清に含まれている A2780GFP の GFP 遺伝子を PCR で増幅することができた。これは市販のセルフリー DNA 回収キットなどを利用した場合と同じスケールにおける実験である。しかし、それをライブラリーの利用を想定した実験系までスケールアップすることは出来なかった。そこで解析用の試料を培養上清から遠心分離した死細胞のみに限定し、そこから DNA を精製した。死細胞中の DNA は分解が進んでおり、短い断片となっていることが想定されるが、そのような DNA 断片も逃すことなく精製できる方法が望ましい。そこで、DNA の鎖長によって収率が変動するカラム吸着法は採用せず、界面活性剤とタンパク質変性剤をベースとした溶液で死細胞を溶解し、その後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行う事で DNA を精製した。この方法を用いることで長鎖から短鎖まで幅広い鎖長の DNA を高

純度で回収することが可能である。また、アドリアマイシンは DNA の 2 本鎖に結合するインターカレーターであるが、本研究で確立した精製法を用いることで DNA から除去することが可能であった。

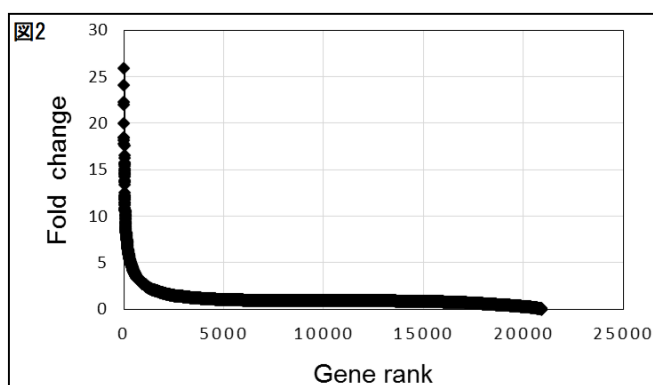
(2) NGS 解析用ライブラリー作製法の確立

死細胞より精製した DNA を鋳型として、ゲノム DNA に挿入されているベクター由来の gRNA 配列を PCR 法により増幅した。文献 (4) をもとにしてプライマーを設計し、Ion Amplicon Library Preparation (Fusion Method) 法を改変した方法で PCR を行った。増幅される DNA 断片の鎖長はプライマー配列を含めて約 200 塩基である。この 200 塩基の PCR 産物うち gRNA 配列は 20 塩基であり、この領域にライブラリーの多様性が存在する。つまり、PCR 産物の両端には、多様性のある gRNA 配列と比較して、長い共通の配列が存在することになる。このような PCR 産物は、PCR サイクルの後半で反応が飽和する場合に、高頻度でハイブリッドを形成することが明らかになった。このハイブリッド PCR 産物の 2 本鎖 DNA は、それぞれが異なる gRNA 配列に由来しており、その後の NGS 解析で解読が不可能になる。条件検討の結果、ハイブリッド PCR 産物は期待される PCR 産物の鎖長 (200bp) より電気泳動での移動度が小さいことが判明し、それを指標とすることで PCR サイクル数の最適化が可能になった。また、実験環境を整えることで、NGS 解析から得られる情報量を増やすことが可能になった。

(3) 特定の環境におけるがん細胞の生存に必須な遺伝子の探索

本研究の目的はがん細胞の生存に必須な遺伝子を探索することである。本研究の立案段階では、複数種類のがん細胞株に対して生存必須遺伝子の探索を行い、その結果を比較することで、細胞の生存に普遍的に必須な遺伝子群と特定のがん細胞の生存に必須な遺伝子 (ドライバー遺伝子など) を同定することを目指していた。しかしながら研究を進めて行く過程で、本研究による死細胞由来の DNA を解析対象としたポジティブスクリーニング法では立案当初の構想を実現することが困難であることが予想された。その理由として、(1) ゲノム編集による 2 本鎖 DNA の切断自体が細胞死を誘導すること、(2) レンチウイルスベクターによるゲノム編集では死細胞を回収するタイミングを決定することが難しいこと、が挙げられる。また、研究開始後にネガティブスクリーニング法によるフィットネス遺伝子同定の報告が相次いでいることから、本研究の特徴を生かせるよう、探索の条件を狭めることとした。がん細胞は低酸素や低栄養などの環境に適応し、その悪性度を高めることが知られている。また、化学療法においても抗がん剤に対する耐性の獲得が問題となっている。このような特定の環境での生存に必須な遺伝子の探索であれば、死細胞由来の DNA を解析する本研究方法で可能となる。そこで、抗がん剤であるアドリアマイシンに対する耐性を獲得している A2780ADR 細胞に対して gRNA ライブラリーを用いた網羅的な遺伝子破壊を行い、アドリアマイシン耐性に関する遺伝子の探索を試みた。Cas9 を発現している A2780ADR に対して gRNA 導入し、2 週間培養を続けることでゲノム編集が起こる時間を十分に確保した後、アドリアマイシン処理を行い、ディッシュから遊離した死細胞を回収した。ここで細胞死が誘導されたものは、ゲノム編集によってアドリアマイシン耐性に関する遺伝子が破壊されたものであると予想される。死細胞から回収した DNA を鋳型として NGS 解析用のライブラリーを作製し、Ion PGM で解読した。同様にアドリアマイシンを処理していない細胞についてもデータの取得を行い、両者の比較によって、

アドリアマイシン処理においてリード数の増加の程度が大きい遺伝子のランキングを作製した。まず、NGS 解析から得られた情報の特徴をつかむために、独立した 2 回の実験で取得した各遺伝子のリード数を合計したものをもとにランキングを作製した結果を図 2 に示す。このランキングのうち、アドリアマイシン処理でリード数が 5 倍以上に上昇したものは対象となる全遺伝子の 1.6% (338 遺伝子) であった。本研究で得られた 338 遺伝子のうち、文献 (3) でコアフィットネス



遺伝子とされている 1580 遺伝子と重複したものは 9 種類のみであり、この死細胞の DNA を標的としたスクリーニング系では細胞の生存に普遍的に必須な遺伝子は探索対象から排除されている。この結果は、フィットネス遺伝子がゲノム編集によって破壊された結果としてアドリアマイシン感受性が高まったのではないことを示唆している。次に、上記の 2 回の実験結果をもとにして A2780ADR 細胞のアドリアマイシン耐性に関する遺伝子を探索した。この 2 回の実験から得られたそれぞれのランキングから、アドリアマイシン処理によってリード数が 2.5 倍以上に上昇した遺伝子を選び出した。それらの遺伝子のうちで、2 回の実験に共通して現れたものは 81 種類であった。その中から上位 4 種類の遺伝子 (TCF7L2、NOD1、PAIP2B、CCDC6) を選択し、アドリアマイシン耐性への関与を評価した。なお、選択した 4 種類の遺伝子はいずれも図 2 のランキングで上位 30 位以内に入っている。A2780ADR 細胞に siRNA

を導入し、その3日後にアドリアマイシンを添加した。2日間のアドリアマイシン処理の後、MTSアッセイによってアドリアマイシン未処理の細胞に対する生存率を評価した。各遺伝子につき2種類のsiRNAを用いて実験を行ったところ、NOD1に関してはいずれのsiRNAに対しても細胞生存率の低下は観察されなかったが、他の3種類の遺伝子に関しては少なくとも1種類のsiRNAで生存率の低下が観察された。特にCCDC6では2種類のsiRNA共に30%以上の生存率の低下が観察された。これらの遺伝子産物とアドリアマイシン耐性との機能的な関連は現在のところ不明である。しかし、クリーニング系から得られた情報を機械的に適用し、それによって選択された標的遺伝子の発現抑制でアドリアマイシンの殺細胞効果が回復した結果は、本スクリーニング系の有用性を表していると考えられる。

本研究で確立したスクリーニング法は、抗がん剤耐性を獲得したがん細胞に対する新たな治療標的分子の探索に利用できるだけでなく、低酸素や低栄養などの特定の環境に適応したがん細胞に対しても利用が可能であると考えられる。網羅的な遺伝子破壊を行った細胞集団に対して環境の変化を誘導し、変化に適応できずに死んだ細胞由来のDNAを解析することで、その環境での生存に必須な遺伝子を同定することが可能であろう。また、本研究はポジティブスクリーニング系であるため、そのNGS解析から出力されるデータ量は多くはなく、情報処理に不得手な研究者でも利用可能な汎用性の高い方法であると考えられる。

<引用文献>

- (1) Wang, T et al. Science 343, 80-84 (2014)
- (2) Shalem, O. et al. Science 343,84-87 (2014)
- (3) Hart, T. et al. Cell 163,1515-26 (2015)
- (4) Joung, J. et al. Nat Protoc. 12,828-63 (2017)

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〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。