

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22816

研究課題名(和文)個別化医療への実用を目指したゲノム編集による胆嚢癌新規マウスモデルの開発

研究課題名(英文)Development of a new gallbladder cancer mouse model using CRISPR-Cas9 system to evaluate the effect of personalized therapy

研究代表者

井手野 昇 (Ideno, Noboru)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90883421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆道上皮にはKrt19が発現していることに着目し、Krt19を発現する組織特異的にCas9を発現するKrt19-CreERT; LSL-Cas9マウスを作成した。胆嚢癌に頻度が高いドライバー遺伝子として、KRAS、TP53、SMAD4を、治療標的となりうるCDKN2Aを選択した。これらの遺伝子に機能獲得型の変異を生じさせるguide RNAをデザインし、予測通りのゲノム編集が生じるかをin vitroで確認した。AAVベクターにこれらの2-3遺伝子のguide RNAを組み合わせてクローニングし、AAV作成は完了した。今後は胆嚢上皮にAAVを注入して胆嚢癌発生を確認する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆嚢癌には併存する複数の仮想的driver遺伝子がある。これらが併存した場合の各遺伝子変異の機能が明らかではないため、遺伝子変異を標的とした治療の有効性を検証するためには、同じ組み合わせの仮想的driver遺伝子を持つpre-clinical modelが必要である。申請者が開発中のCRISPR/Cas9 systemによる胆嚢癌遺伝子改変マウスモデルを応用して、ヒト胆嚢癌の遺伝子情報に基づいて癌を自然発生させたモデルを短期間で作成し、分子標的薬の効果を予測することで、それぞれの患者により効率的な治療を提供できる可能性があり、予後不良な胆嚢癌の治療成績向上に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a transgenic mouse model Krt19-CreERT; LSL-Cas9, specifically expressing Cas9 in biliary epithelium. Based on available public data, we selected KRAS, TP53, SMAD4 as frequent drivers for gallbladder cancer. As potential therapeutic target, CDKN2A was added to 2 drivers, KRAS/TP53, or SMAD4/TP53. We designed guide RNA to induce gain-of-function mutations in these drivers. After confirmation that each guide RNA worked for genome editing in vitro study, guide RNAs for 2 or 3 driver genes were cloned into AAV vector and generated and purified AAV. The completed works for this study were development of CK19-Cas9 mouse model and generation of AAV containing guide RNA for 2 or 3 driver genes. We are starting injection of AAV into gallbladder of Krt19-CreERT; LSL-Cas9 mice once sufficient number of mice is available, and evaluating phenotypic difference according to edited drivers.

研究分野：胆膵悪性腫瘍

キーワード：Gallbladder cancer CRISPR-Cas9 system

1. 研究開始当初の背景

胆嚢癌は早期診断が容易でなく、生物学的悪性度が高いため、癌遺伝子情報に基づいた効果的な” precision medicine” の開発が急務である。胆嚢癌には併存する複数の仮想的ドライバー遺伝子がある。これらが併存した場合の各遺伝子変異が癌の形質変化に与える影響は不明であるため、遺伝子変異を標的とした治療の有効性を検証するためには、個々の患者と同じ組み合わせの仮想的ドライバー遺伝子を持つ pre-clinical model が必要である。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 system によるゲノム編集技術を応用して、ヒト胆嚢癌と同じ複数の仮想的ドライバー遺伝子変異を持ち、短期間で胆嚢上皮より自然発生する胆嚢癌のマウスモデルを作成する。またドライバー遺伝子として、治療標的となりうる遺伝子を組み込み、実際に分子標的薬の効果があるかを検証する。

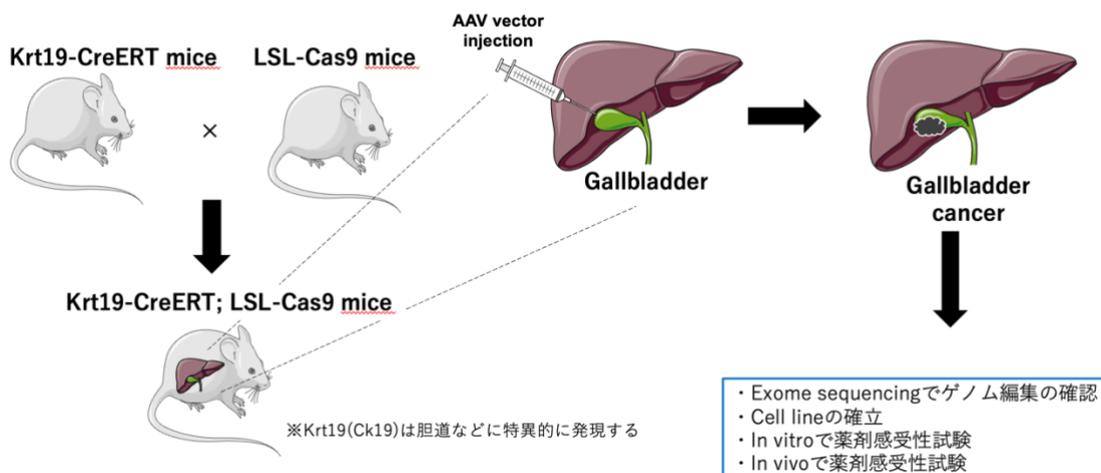
3. 研究の方法

1) Guide RNA (gRNA) のデザイン, 選択

胆嚢癌で高い頻度で変異がみられる Tp53 (P), Smad4 (S), Kras (K) をドライバー遺伝子として選択した。さらに比較的まれではあるが、治療標的となりうる遺伝子として Cdkn2a (C) を選択した。Tp53/Smad4 v. s. Tp53/Smad4/Cdkn2a 及び、Tp53/Kras v. s. Tp53/Kras/Cdkn2a のドライバー遺伝子の組み合わせでゲノム編集を行うために、それぞれの遺伝子を標的とした guide RNA (gRNA) の候補を複数設計する。これらの gRNA を backbone となる PX459 プラスミドにクローニングした後、PX459 をマウス膵癌組織から樹立した KPC 細胞にトランスフェクションし、ゲノム切断を resolvase assay にて確認する。切断効率が最も高い gRNA を選択する。

2) AAV (adeno associated virus : アデノ随伴ウイルス) ベクターの作成, 産生, 精製

Kras (K)/Tp53 (P)/Lkb1 (L) を標的とした gRNA および Kras G12D HR template (HR : Homology-directed repair) を持った AAV-KPL プラスミドをベースにサブクローニングを行い、AAV-PS・AAV-PSC 及び AAV-PKC・AAV-PK を作成する。それぞれの AAV ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、AAV を産生させ、精製する。



- 3) **K19-Cre ; LSL-Cas9 マウスの作成**, AAV 注入胆管上皮マーカーである K19 依存性に Cre を発現する K19CreERT マウスと Cre 依存性に Cas9 を発現する LSL-Cas9 マウスを交配し, 胆管上皮特異的に Cas9 を発現する K19-Cre;LSL-Cas9 マウスを作成する. 胆嚢壁に AAV ベクターを注入し, 実際にゲノム編集が行われ, 胆嚢癌が発生するかを観察する. 胆嚢癌が発生した場合は細胞株を樹立し, 分子標的薬の薬剤感受性の違いを *in vivo*, *in vitro* で評価する.

4. 研究成果

1) Guide RNA (gRNA) のデザイン, 選択

Cdkn2a をノックアウトするために, Cdkn2a を標的とした gRNA①～③を下記のように 3 種類設計した.

Cdkn2a gRNA① 5' -CACCGCGCTGCGTCGTGCACCGGG-3'

5' -AAACCCCGGTGCACGACGCAGCGC-3'

Cdkn2a gRNA② 5' -CACCGGAACGTCGCCAGACCGAC-3'

5' -AAACGTCGGTCTGGGCGACGTTCC-3'

Cdkn2a gRNA③ 5' -CACCGTGCATATTTGCGTCCGCT-3'

5' -AAACAGCGGAACGCAAATATCGCAC-3'

Cdkn2a gRNA①～③をバックボンプラスミドである PX459(addgene Plasmid #62988)へクローニングした. 予備実験として KPC 細胞にトランスフェクションし, ゲノム切断を Guide-it Mutation Detection Kit(タカラバイオ #631488)にて確認した. ゲノム切断は, gRNA①～③すべてで認めた(図 1). より切断効率の高かった Cdkn2a gRNA①を本実験に用いる配列とした.

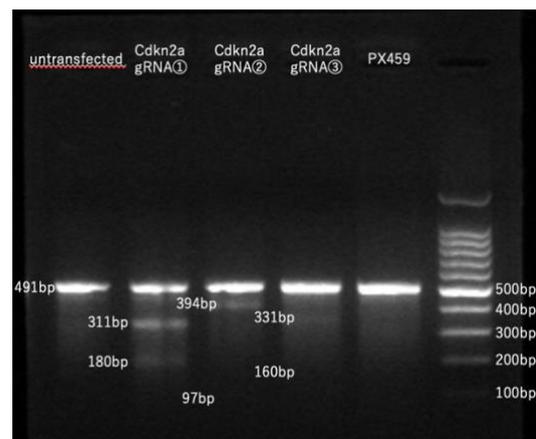


図 1. ゲノム切断効率の確認

Smad4 の gRNA に関しては以前報告のある下記の配列を使用することとした.

Smad4 gRNA 5' -CACCGATGTGTCATAGACAAGGT-3'

5' -AAACACCTTGCTATGACACATC-3'

2) AAV (adeno associated virus : アデノ随伴ウイルス)ベクターの作成, 産生, 精製

AAV のバックボンプラスミドである ITR-U6-sgRNA (Kras)-U6-sgRNA (p53)-U6-sgRNA (Lkb1)-pEFS-Rluc-2A-Cre-shortPA-

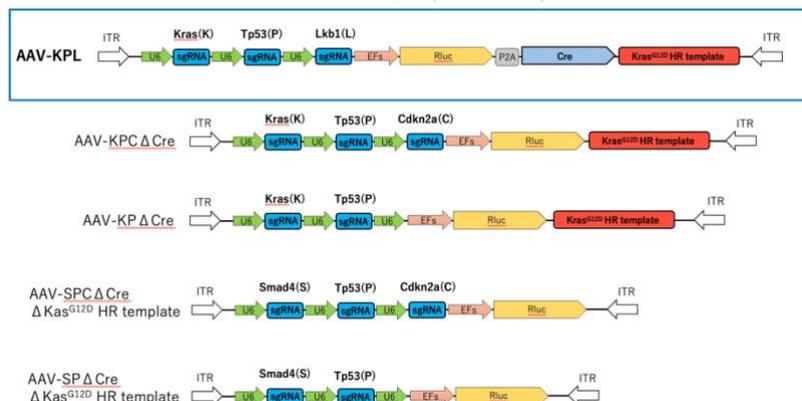


図 2. 作成した AAV ベクター

KrasG12D_HDRdonor-ITR(以降, AAV-KPL)(addgene Plasmid #60224)に前述の gRNA をサブクローニングすることにより, 4 種類の

AAV ベクターを作成した(図 2). HEK293T 細胞を培養面積 3180 cm²の培養チャンバーで大量培養した後, pAAV ベクター, pHelper ベクター, pRepCap ベクターをトリプルトランスフェクションすることで, AAV を産生した. Optiprep(コスモバイオ #1893)を用いた密度勾配超遠心法(350,000 g×90 分)にて AAV 粒子を分離・抽出し,バッファー交換を行なって精製した.

3) K19-Cre ; LSL-Cas9 マウスの作成

The Jackson Laboratory より得た 2 系統のマウス Krt19tm1 (cre/ERT)Ggu/J(以降, Krt19-CreERT) (Strain # 026925), B6J.129(B6N)-Gt (ROSA)26Sortm1 (CAG-cas9, EGFP)Fezh/J(以降, LSL-Cas9) (Strain # 026175)の凍結胚を胚移植し, SPF 化した. テールカットサンプルより DNA を抽出してジェノタイピングを行なって(図 3), 目的のマウスの heterozygous 個体であることを確認した. 2 系統の heterozygous 個体を交配させ, テールカットサンプルより DNA を抽出して, 同様にジェノタイピングを行なって, Krt19 を発現する組織特異的に Cas9 を発現する Krt19-CreERT;LSL-Cas9 マウスを得た.

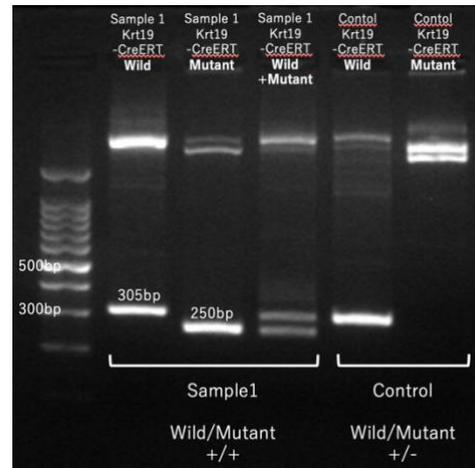


図 3. Krt19-CreERT マウスのジェノタイピング

4) 今後の方針

Krt19-CreERT;LSL-Cas9 マウスにタモキシフェンを腹腔内投与し, Cas9 を胆道上皮に発生させた状態で精製した AAV を注入して形質発現を確認, 予定していた薬剤感受性試験を *in vivo*, *in vitro* で行う.

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