

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16256

研究課題名（和文）CRISPR/Cas9システムを用いたFAM46Cのゲノム編集および表現型解析

研究課題名（英文）Genome editing and phenotyping of FAM46C using the CRISPR/Cas9 system

研究代表者

金杉 丈（KANASUGI, Jo）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：00805450

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）：マウス皮下移植を行い、FAM46C発現の違いによる増殖変化を認めていた。今後骨髓腫患者検体からのCD138陽性の形質細胞分取に必要な磁気活性化細胞分離選別（magnetic activated cell sorting；MACS）装置を用いた骨髓腫細胞分取とゲノム、RNA、タンパク質の抽出作業を行い、実臨床への応用を想定した研究を行う予定であった。しかし新型コロナウイルス感染症の流行に伴う診療業務の増加に伴い、想定外の業務が発生することが多くなった。そのため、研究を計画的に遂行することが困難となり、研究時間を十分に確保できなかった。以上の事由により、研究成果を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髓染色体解析から、二倍体や転座、欠失・増幅の染色体異常は把握できるものの、骨髓腫の増悪に係わるゲノム異常や分子機構はよくわかっていない。近年、新規薬剤が一定の治療成績の向上を達成しているが、依然として治癒に至る例は少ない。初回の治療が奏功したように見えても短期間で再発する症例が多く、既存の薬剤では根治が極めて難しい。その最大の原因は、骨髓腫の悪性化と薬剤耐性であり、難治性骨髓腫を克服できる治療が切望されている。今回は十分な成果を得ることが困難であったが、本研究は、骨髓腫細胞の悪性化と進展に関わる病態の解明に活路を開き、実臨床での抗骨髓腫薬開発のブレイクスルーになると今後期待される。

研究成果の概要（英文）：Subcutaneous transplantation into mice was performed, and proliferation changes due to differences in FAM46C expression were observed. In the future, I will work on myeloma cell sorting and genome, RNA, and protein extraction using a magnetic activated cell sorting (MACS) device, which is necessary for sorting CD138-positive plasma cells from myeloma patient specimens. We planned to conduct research on the assumption that it would be applied to actual clinical practice. However, with the increase in medical care work associated with the epidemic of the new coronavirus infection, there were many unexpected tasks. Therefore, it became difficult to carry out research systematically, and it was not possible to secure sufficient research time. For the above reasons, we were unable to obtain research results.

研究分野：血液内科

キーワード：多発性骨髓腫 FAM46C遺伝子 CRISPR/Cas9システム ゲノム編集 シグナル伝達経路 造腫瘍性 薬剤感受性

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は形質細胞がんで、単クローン性免疫グロブリン (M 蛋白) の増加や、骨病変、腎障害、免疫不全を特徴とする極めて難治性の血液疾患である。近年、新規薬剤が一定の治療成績の向上を達成しているが、依然として治癒に至る例は少ない。その最大の原因は、骨髄腫の悪性化と薬剤耐性であり、難治性骨髄腫を克服できる治療が切望されている。そこで、研究代表者は骨髄腫患者において高頻度に欠失が見られる *FAM46C* 遺伝子に着目した。*FAM46C* の欠失は、骨髄腫患者の予後に関わる重要なゲノム異常の 1 つとされているが、その作用機序は未だに明らかではない。骨髄染色体解析から、二倍体や転座、欠失・増幅の染色体異常は把握できるものの、骨髄腫の増悪に係わるゲノム異常や分子機構はよくわかっていない。Manier らは、骨髄腫細胞の遺伝子を網羅的・量的に解析する方法を開発し、*FAM46C* 遺伝子変異が高頻度にかかわっていることを初めて明らかにした (図 1、文献 1)。しかも、*FAM46C* 遺伝子が欠失していると、骨髄腫の予後は著しく不良であった (図 2、文献 2)。del (1p) は、新たに診断された骨髄腫患者の約 20% で検出され、骨髄腫の予後不良と関連している。また、1p12 に位置する *FAM46C* の遺伝子変異は、新たに診断された骨髄腫患者の約 8% で検出された。

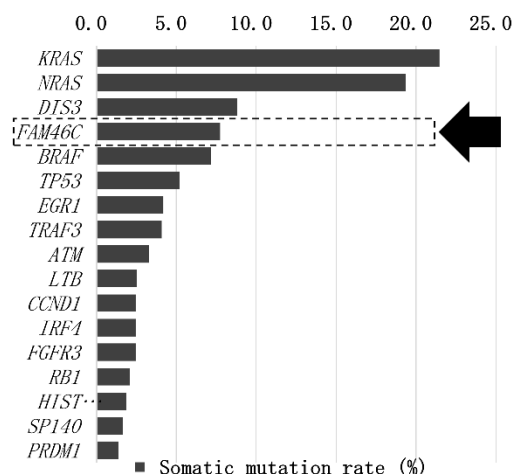


図1. MM患者に関連する変異遺伝子リスト。MM患者に見られる遺伝子変異の中でも、*FAM46C* は *KRAS* や *NRAS* に次いで変異頻度が高い。(文献1より改変引用)

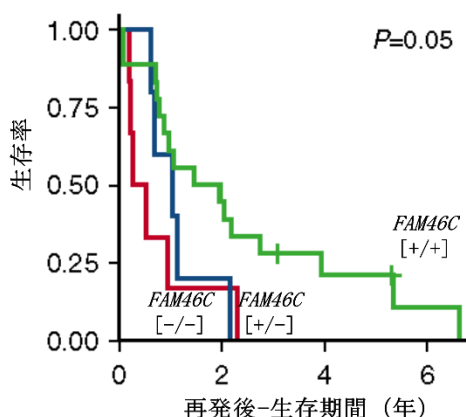


図2. *FAM46C* の欠失はMM患者の予後不良に関係する。*FAM46C* 遺伝子領域の両アレルの欠損だけでなく、片アレルの欠失や変異があると、再発後の予後は著しく不良となる。(文献2より引用)

2. 研究の目的

代表者が着目する *FAM46C* 遺伝子に関しては、患者検体を用いた遺伝子変異頻度と予後との関連性について主に疫学的な研究が行われた (文献 2)。その結果、*FAM46C* の遺伝子変異が骨髄腫患者の生存期間の短縮と密接に関わる可能性が示唆された。そこで本研究では、代表者は骨髄腫細胞株における *FAM46C* 遺伝子の機能解析を行い、*FAM46C* の欠損が細胞増殖、造腫瘍性、細胞遊走能、薬剤感受性にどのような影響を与えて骨髄腫病態に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

代表者は CRISPR/Cas9 システムを利用して、骨髄腫細胞株 OPM2 の *FAM46C* 遺伝子を破壊することに成功した (図 3)。樹立した *FAM46C* 破壊 (*FAM46C*^{-/-}) クローンを用いて、細胞増殖能、細胞遊走性や造腫瘍性の解析を行った。

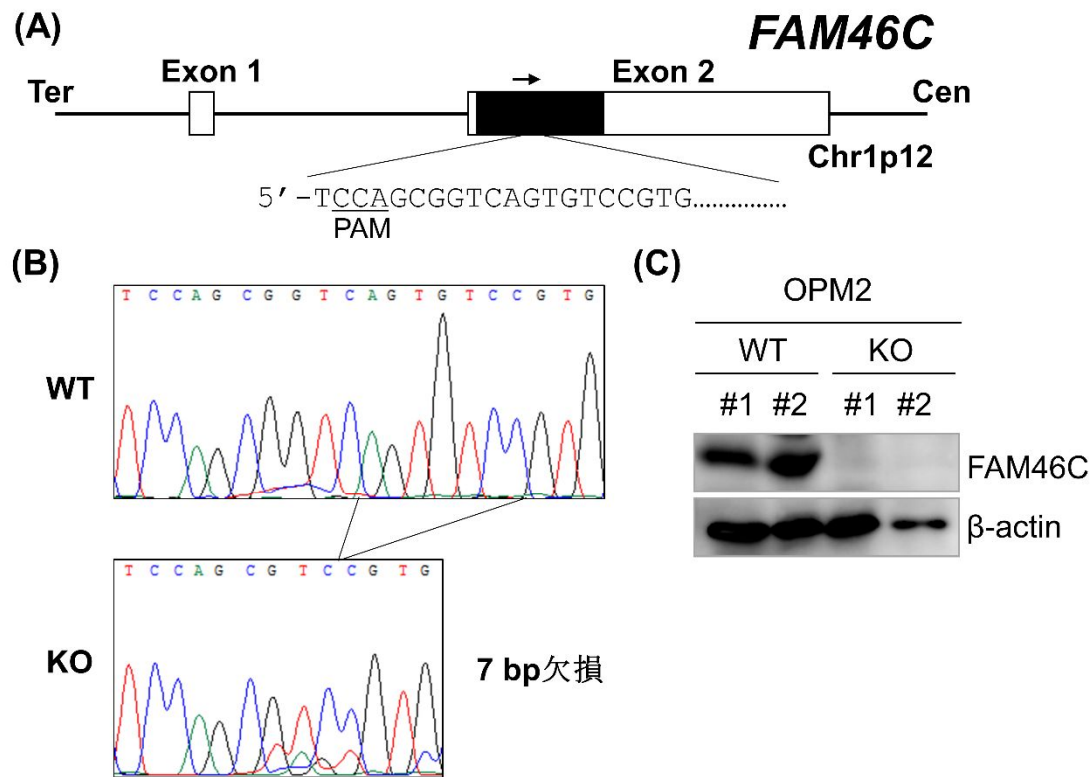


図3. FAM46Cを標的としたCRISPR/Cas9システムと遺伝子破壊.
 (A) *FAM46C*エクソン2のコーディング領域を標的にsingle guide RNAを設計した. (B) *FAM46C*破壊クローン(OPM2細胞)のDNA塩基配列.
 (C) ウェスタンブロッティング解析によるFAM46Cタンパク質の解析.

<参考文献>

- (1) Manier *et al*, *Nat Rev Clin Oncol*, 2016.
- (2) Weinhold *et al*. *Blood*. 2016.

4. 研究成果

骨髄腫細胞における染色体異常は、病勢および薬剤耐性と関連性が高い。染色体 1p12 に座位する *FAM46C* の分子学的機序は、2017 年当時全く明らかになっていなかった。そこで研究代表者は、in vivo, in vitro での骨髄腫細胞増殖・薬剤耐性に関連する *FAM46C* 遺伝子機能を調べる方針とした。ヒト骨髄腫細胞株に対して、CRISPR/Cas9 システムにより *FAM46C* 細胞の両アレルを破壊した細胞株を樹立した。EGFP, Cas9 および *FAM46C* exon14 のための 20bp 単一ガイド RNA 配列を含むプラスミド構築し、Amaxa[®] および GFP ソーティングの後、単一細胞クローニングを行った。さらに Western blotting により *FAM46C* 発現についてスクリーニングした。 *FAM46C* を欠損するクローンに対して、MTT/コロニーアッセイを用いて細胞増殖能を評価した結果、増殖能の亢進が見られた。 *FAM46C* 野生型および欠失型クローンを免疫不全マウス(各 6 匹)に異種移植し腫瘍サイズを比較した結果、 *FAM46C* 欠失型クローン由来の腫瘍成長率は、野生型クローン由来の腫瘍成長率よりも大幅に高い結果であった。また Kaplan-Meier 生存分析では、野生型クローン由来腫瘍を異種移植したマウスよりも、欠失型クローン由来腫瘍を異種移植したマウスの方が、有意に生存期間が短かった。このことから *FAM46C* が in vitro および in vivo の両方で腫瘍形成に極めて重要な役割を果たす可能性があることが示唆され、ヨーロッパ血液学会において報告した (Kanasugi et al, 23th

EHA, 2018)。その後、樹立したクローンに対して抗腫瘍薬であるボルテゾミブ・ポマリドミド・レナリドミドのほか、PI3K 阻害薬としてアフレセルチブを用いて薬剤感受性を検討した。Western blotting 分析を用いて、FAM46C 野生型クローン由来腫瘍と比較して欠失型クローン由来腫瘍では Thr308 と Ser473 の両方でリン酸化 Akt が増加していた。このことから遺伝子発現解析においても PI3K-Akt シグナルが活性化している可能性が示唆され、日本血液学会学術総会において報告した(金杉 丈ら、第 80 回日本血液学会学術集会, 2018)。その後、FAM46C 野生型 OCI-My5 細胞と比較して、アフレセルチブ処理後の FAM46C 欠失細胞の生存率が有意に低いことを示した。また、MTT アッセイでは、アフレセルチブとボルテゾミブの併用治療により、FAM46C 欠失 OCI-My5 細胞の生存率が、いずれかの単剤治療と比較して有意に減少した。このことから FAM46C の喪失が、PI3K-Akt シグナル伝達経路を媒介することによって細胞の生存と増殖を増強する可能性が示唆された。さらに FAM46C 欠失細胞における GSEA 解析では、腫瘍抑制遺伝子、ホスファターゼおよびテンシンホモログ(PTEN; PTEN_DN.V1_DN)に関連する遺伝子の有意な不活性化が認められた。PTEN は PI3K-Akt シグナルを抑制することでがん細胞の増殖を抑制していると考えられており、定量分析キットを使用して FAM46C 破壊と PTEN 活性について調べると、FAM46C 野生型 KMS-11 細胞よりも FAM46C 欠失型 KMS-11 細胞で有意に低い結果となり、FAM46C 発現と PI3K-Akt シグナル伝達経路との関連が示唆された。以上のことから FAM46C の欠失により PTEN の活性が抑制・低下し、PI3-Akt シグナルの抑制も低下する一方で Akt リン酸化が亢進し、骨髓腫細胞の増殖が亢進すると考えられた。そこで研究代表者は、Cancer science 誌において報告した(Kanasugi J et al, Cancer science, 2020)。今後の展望として、当大学・血液内科学講座は、患者検体からの CD138 陽性の形質細胞分取に必要な magnetic activated cell sorting (MACS) 装置を配備している。今後骨髓腫患者検体からの MACS 法による骨髓腫細胞分取とゲノム、RNA、タンパク質の抽出作業を行うことで、実臨床を想定した条件で検証予定であった。しかし新型コロナウイルス感染症の流行や臨床現場の業務増加により、予定外の仕事が急に発生することが多く、計画どおりに研究を行うことが困難であった。上記の理由から

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
研究協力者	太田 明伸 (OTA Akinobu)		
研究協力者	花村 一朗 (HANAMURA Ichiro)		

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