

2019年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

2020年4月27日提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 下村 巖



研究課題：

(テーマ)

CRISPR-Cas9により正常細胞へ導入された遺伝子変異の発がんへの寄与率の網羅的探索

研究期間： 自 2019年4月1日

至 2020年3月31日

研究指導者： 氏名 山本 雄介



公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェローペリオード中の研究について

CRISPR-Cas9 により正常細胞へ導入された遺伝子変異の 発がんへの寄与率の網羅的探索

下村 嶽

国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 特任研究員

Key words: 肺がん、正常細胞、遺伝子変異、多段階発がん、CRISPR-Cas9

要 旨

がんは遺伝子の病気であり、肺がんでは喫煙の関与も大きく影響するものの、EGFR、ALK、RET 遺伝子変異などが発がんの重要な機序として注目されている。発がんにおける遺伝子変異の研究は様々に取り組まれ、細胞株などを用いた研究で有用な報告も見られるが、同定されたがんの遺伝子変異が、実際はどの程度、どのように発がんや転移能の獲得に寄与しているかは不明な点が多く、正常細胞に対して CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子変異を多段階的に導入することによるがん化の過程の網羅的探索は見受けられない。本研究では、(1) CRISPR-Cas9 を用い、正常細胞に対して複数の多段階的な遺伝子変異を導入し、実際の病態に近い発がんモデルを作製し、(2) 発がん過程に関与する遺伝子変異の寄与率の定量的な解析を行う。(3) 免疫不全動物に、遺伝子編集により発がんした正常細胞を移植した動物モデルを作製し、薬剤の効果などを検証する。上記(1)-(3)を目的とする。この研究から、ゲノムの異常を正常細胞において正確に反映し、再現することが可能となり、ドライバー遺伝子の腫瘍形成過程における実際の機能の検証を実現する。

序

[研究の学術的背景]

がん細胞の起源は遺伝子の異常であり、多くの場合は複数の遺伝子異常が蓄積されることによりがん化が引き起こされることは周知となっている。この概念は、1988年にVogelsteinらにより大腸がんの発生における遺伝子変異という報告から、多段階発がん説として提唱された。以来、がんと遺伝子との研究は、がん発生起源の歴史に膨大な足跡を残している。2001年にヒトゲノム全配列が解読され十数年が経過し、ゲノムワイド関連解析や次世代シークエンサー技術などのゲノム解析技術は飛躍的な発展を遂げている。しかし、同定されたがんの遺伝子変異の綿密な機能解析は行われておらず、実際はどの程度、また、どのように発がんや転移能の獲得に関与するかについては不明な点が多い。近い将来には、がん診断においてもゲノム解析が診断の主流となり、臨床現場への応用が予想されることから、そのメカニズムを正確かつ網羅的に解析することは喫緊の課題と言える。

[本研究の具体的な目的]

- 1.) CRISPR-Cas9 を用い、正常細胞に対して複数の多段階的な遺伝子変異を導入し、実際の病態に近い発がんモデルを作成する。
- 2.) 発がん過程に関与する遺伝子変異についてその寄与率を定量的に解析する。
- 3.) 発がん細胞を免疫不全動物へ移植することにより、生体内での腫瘍の形成、また薬剤の効果などを検証する動物モデルを作製する。

上記のように、本研究では正常細胞に複数の遺伝子を多段階的に CRISPR-Cas9 でゲノム編集したモデルを樹立することで、より詳細かつ特異性の高い実験系を計画することが可能となる。

実験方法

[1. CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA の作製]

本研究では、肺がんを対象疾患とする。近年の大規模ゲノム配列解読の研究から肺がんでは組織型別に発現する遺伝子変異が異なることが分かっている。現時点では、非小細胞肺がん(腺がん、扁平上皮がん)に着目して検討を行う。標的とする候補遺伝子については、腺がんでは KRAS、KEAP1、STK11、SMARCA4、扁平上皮がんでは PTEN、FAT4、Notch1、NFE2L2 を予定している。候補遺伝子は暫定的に選別してあるが、検定の過程で解析の必要性が考えられる遺伝子はその都度、追加で解析する。遺伝子変異に対応する CRISPR-Cas9 のガイド RNA のデザインを行う。オフターゲット効果を想定し、それぞれの遺伝子について 2 つずつのガイド RNA を作製する。ガイド RNA の作製については、*S.pyogenes* 由来の CRISPR-Cas9 システムをベースとして、ダブルニッキング法によりオフターゲット作用変異誘発の頻度を下げたデザインモデルを用いる。

[2. ガイド RNA の正常細胞への導入]

遺伝子編集のため作製したガイド RNA について、検討を行う細胞に導入する。導入の方法としては、物理的なアプローチとしてエレクトロポレーション法を予定していたが、プラスミドのリポフェクション法へと変更することとした。この方法も、ゲノム編集効率が高く、Cas 遺伝子が残存し、タンパク質を発現し続けることによりオフターゲット効果を最小限に抑えることができる。これらの最新の技術を活用することでより精度の高い CRISPR-Cas9 システムを活用することを目的とする。この遺伝子編集効率の向上が重要な課題と考えられ、変異導入効率の高い Cas9 及びガイド RNA の選定を重視する。

[3. 遺伝子変異を導入した細胞の安定培養、動物モデルの作製]

遺伝子変異を導入した細胞の安定培養を試みる。遺伝子変異を導入する際の一塩基多型については基本的に片側アレル変異の導入を予定し、遺伝子の欠損の導入なども予定している。片側アレル変異を導入するための CRISPR-Cas9 の実験系は、研究協力者の

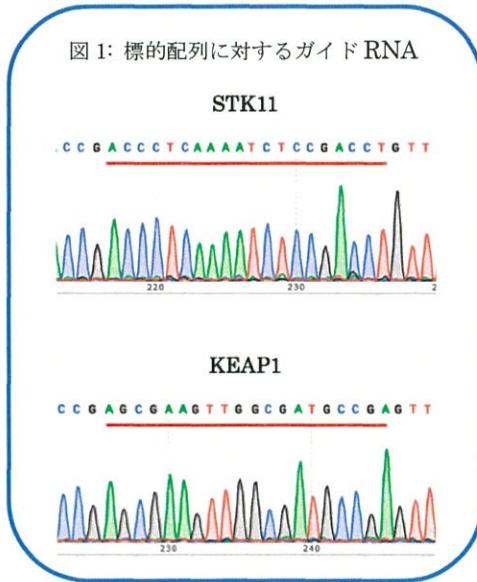
川又が行う。培養条件については、既報から FGF7、FGF10、BMP4、TGF- β といった因子を加え、近年 iPS 細胞から肺胞上皮細胞を培養する上で重要とされる Wnt シグナル伝達経路促進作用を有する CHIR99021、レチノイン酸なども加える因子として検討している (Yamamoto, et al., Nat Methods. 2017)。培養条件については、共同研究者と共に調整・検討を行っていく。複数の遺伝子変異を多段階的に導入し、さらに安定培養が確認された細胞について、実際に生体内での腫瘍形成能に変化の検討を目的として、免疫不全マウスへの移植効率を検討する。腫瘍増殖能が確認された場合、その細胞増殖性や抗がん剤を含めた化合物による影響を検討していく。この際、解析過程で治療標的となる遺伝子が同定された場合は、合成致死といった概念の元に、化合物の組み合わせにより相加・相乗的な効果を及ぼすものがあるかについても検討を予定している。

結 果

[1. CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA の作製]

ガイド RNA の作製にあたり、本研究の対象疾患である肺がんにおいて重要な遺伝子とされる KRAS、KEAP1、STK11、SMARCA4 (腺がん) や、PTE、FAT4、Notch1、NFE2L2 (扁平上皮がん) についてデザイン、作製を行っている。塩基配列の設計デザインは CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp>) を用い、各遺伝子の標的配列に対応するオリゴヌクレオチドを作製した。用いるプラスミドベクターとしては、Feng Zhang lab の pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (<https://www.addgene.org/48138/>) を使用し、Zhang lab のプロトコール (Ran FA, et al., Nat Protoc. 2013) に則りクローニングを行なった。クローニングされたベクターの増幅のため大腸菌 (E. Coli DH5 α Competent Cells, TaKaRa) への形質転換を行い、増幅されたプラスミド DNA を単離した。単離された CRISPR プラスミドについて目的のガイド RNA となる配列が挿入されているかの確認のためシーケンス解析を行なった結果、適正な配列を確認した (図 1)。当初の計画通り、オフターゲット効果を想定し、それぞれの遺伝子について 2 つず

つのガイド RNA を作製している。正常細胞へのガイド RNA の導入は容易ではなかつたため、細胞培養や実験手技も簡便に扱える肺がん細胞株である A-549 を用いて今後の実験を行うこととした。

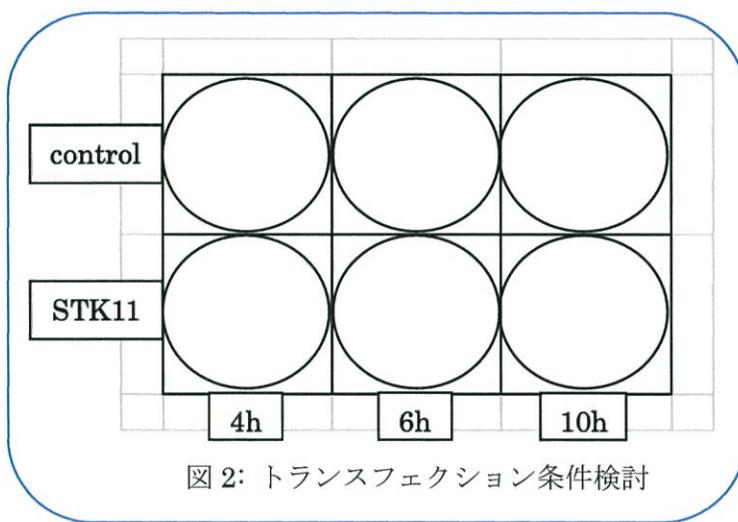


[2. ガイド RNA の細胞への導入]

当初、正常細胞へのガイド RNA の導入にあたり、現在、作製したガイド RNA をがん細胞株に導入することで遺伝子のノックアウト効率の検証を行う予定であったが、細胞培養や導入にあたっての実験手技を容易に行うことができず、まずは肺がん細胞株での検討を行い、その結果から方針を模索することとした。元々、導入方法としては、物理的なアプローチとしてエレクトロポレーション法を用いる予定であったが、導入効率についての条件検討の段階として、化学的アプローチであるトランスフェクション（段階希釈法、抗菌薬を用いたセレクション）、ウイルスベクターを用いた生物学的アプローチについても検討した。その結果、化学的アプローチであるトランスフェクションが効率がよいと考えられ、この方法で実験を進行することとした。

リポフェクション試薬の一つである DharmaFECT Transfection Reagents (GE Healthcare) の試薬を用いて実験を行っていたが、トランスフェクションを行ったのちのピューロマイシンを用いたセレクションの段階で条件を変更してもほぼ全ての細胞が死滅してしまう現象が起こってしまった。しかし、この試薬は siRNA などを用いた

RNAi 実験の際に用いられるもので、プラスミドのトランスフェクションには適さないと考えられ、ThermoFisherScientific 社の Lipofectamine 2000 を使用することとした。control として、ガイド RNA を挿入していないプラスミド、対象として STK11 のガイド RNA を挿入したプラスミドを用いることにした。トランスフェクションでは、他にトランスフェクション試薬のみを細胞に添加した場合も検証したが、control をトランスフェクションした場合でも、試薬のみと比較した場合に細胞増殖は顕著に阻害されたことから、プラスミド自体も細胞の増殖に影響を与えることが考えられた。また、導入にあたっても、トランスフェクション時間の差異による条件を検討するため 4,6,10 時間といくつかのポイントでのサンプリングを行った（図 2）。



時間依存的にも、細胞増殖は阻害される傾向にあり、CRISPR プラスミドの細胞増殖に与える影響がより明確に認識された。トランスフェクション後、トリプシンを用いて細胞を継代し、ピューロマイシンを用いた抗菌薬耐性によるセレクションを行った。ここでもピューロマイシン暴露時間は 36-48 時間とし、十分なセレクションにより残存した細胞を継代し、シングルコロニーを採取するために希釀して 10cm 細胞培養用ディッシュに播種した。その後 7-10 日培養し、コロニーが形成された段階で顕微鏡下にコロニーピックアップを行い、シングルコロニーから採取した細胞を 96 ウェルプレートに播種した（図 3）。

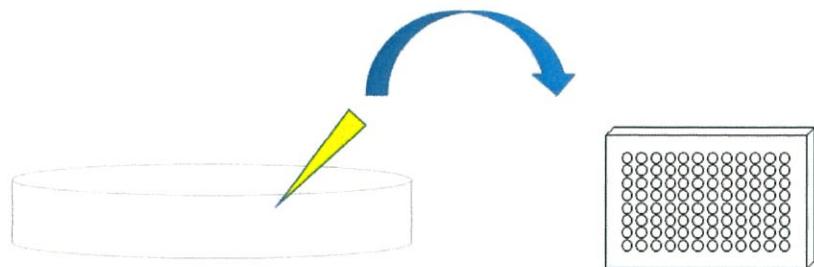


図 3: コロニーピックアップ

実験開始当初のコロニーの採取率は 3 割程度であり、数度の実験を繰り返すことで採取率は 8-9 割程度まで上昇した。96 ウェルプレートで培養した細胞がコンフルに達した段階で継代し、24 ウェルプレートに細胞を播種し培養を行った。その後、DNeay Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA の抽出を行った。播種細胞にはばらつきがあったためか抽出 DNA 量には差異がみられた (図 4)。

Sample Name	Nucleic Acid(ng/uL)
control_1	3.262
STK11_1_1	0.439
STK11_1_2	0.287
control_2	3.527
STK11_2_1	0.488
STK11_2_2	0.367
STK11_2_3	0.821

図 4: 抽出 DNA 濃度

抽出 DNA を用いて PCR を行い、電気泳動を行った結果、設計プライマーにより増幅された領域のバンドを認識することができた（図 5）。STK11_1_3 についてはバンドが検出されず、実験過程、増幅過程で何らかの障害があったと考えられる。PCR 酶素としては KOD FX Neo (TOYOBO) を用い、高い増幅効率での伸長エンハンス効果を期待した。PCR のサーマルサイクラーの条件としては、推奨されている 2 ステップサイクルを用いた（図 6）。しかし、PCR の泳動結果からは十分に STK11 のノックダウンを確認することができず、DNA シークエンス解析にサンプルを提出し、結果を待っているところである。

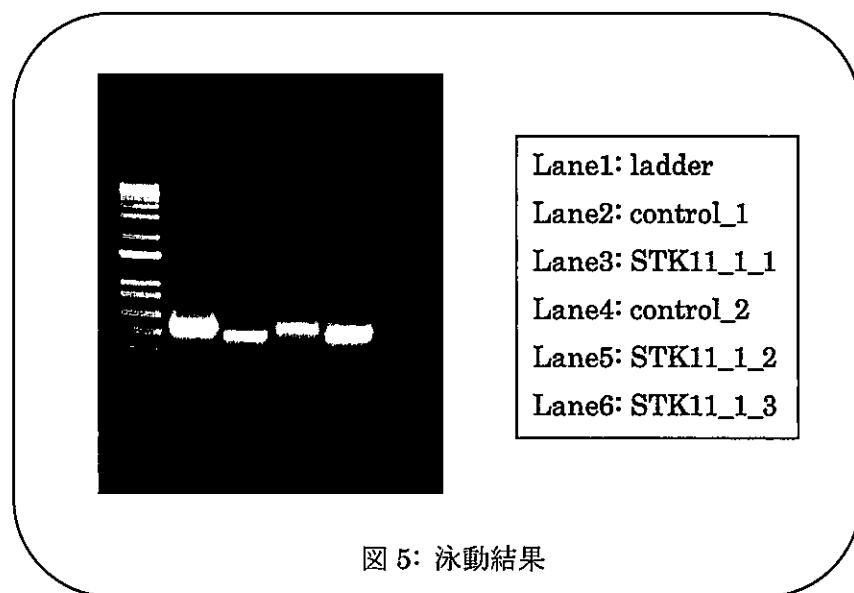


図 5: 泳動結果

	temperature	time	
Predenature	94°C	2 min	
Denature	98°C	10 sec	40 cycle
Extension	68°C	30sec/kb	

図 6: PCR サイクル条件

シークエンスの結果から STK11 のノックダウンが確認された場合、一連のガイド RNA の設計から、細胞への CRISPR プラスマドのトランسفエクション、シングルコロニーからの細胞のピックアップ、適正な DNA 抽出が得られていることが明らかとなり CRISPR システムの系が完成する。これらの手法を元に、そのほかの遺伝子についてもノックダウンを行い、また複数の遺伝子変異のノックアウトを同時、あるいは多段階的に行うことで細胞にどのような影響を与えていくかを評価していく。評価方法としては、まずは細胞の増殖アッセイ、細胞増殖に変化がある場合にはその機序がアポトーシスによるものかどうかの実験、細胞の変化を、免疫染色を含めた実験で評価を行なっていき、メカニズム分析に繋げていく。

[3. 遺伝子変異を導入した細胞の安定培養、動物モデルの作製]

上記 1, 2.の研究項目の進捗により、3.の課題に取り組む予定である。

考 察

正常細胞へのガイド RNA の導入にあたり、導入実験による正常細胞の増殖抑制、細胞死が課題となっている。現在、より増殖能が高く、耐性があると考えられる肺がん細胞株 (A-549) へのガイド RNA の導入を試みているが、導入方法についてはリポフェクションを用いることで有効なノックダウンが得られると考えている。現在は STK11 の一つのガイド RNA による影響を評価している段階であり、肺腺がん、扁平上皮がんで重要となる様々な遺伝子についての評価は十分に行えていない。今回、STK11 についての評価が十分に行われば、実験系の確立を得られ、今後も迅速に他の遺伝子についてのそれぞれの評価を行い、各々の遺伝子変異の発がんへ与える影響の寄与率の網羅的な解析に結び付けていく。

(2) シニア・リサーチフェローワーク期間中の研究成果を、今後の研究 にどのように役立てたいと考えているか

いくつかの問題点は見られるが、当初の計画通り 1. CRISPR-Cas9 システムのガイド RNA の作製の後、2. ガイド RNA の正常細胞への導入の実験を進行している。現在は正常細胞の条件検討の段階として、がん細胞を用いた実験を行なっており、実験系の確立を目指している。実際に実験系の有効性を確認できれば、その他の遺伝子を用いた実験については同様の手法を適応することができ、研究の進行については加速度的に対応することが可能となる。その上で、3. 遺伝子変異を導入した細胞の安定培養、動物モデルの作製についても準備を行なっていく。

また、現在では遺伝子の編集技術において、ガイド RNA を進化させた一塩基編集技術の発展もみられ (Anzalone AV, et al., Nature. 2019)、従来の CRISPR-Cas9 遺伝子編集技術を改良、またさらに精密にゲノム編集を行うことが可能となっており、このような技術との融合、比較実験の検証により更なる精密医療へと繋がっていくと考えられる。

【共同研究者・謝辞】

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 主任研究員 山本 雄介、九州大学生体防御医学研究所 助教 川又 理樹 であり、この場を借りて御礼申し上げる。

【文 献】

1. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013. 8: 2281-2308.

2. Kohsaka S, Nagano M, Ueno T, et al. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med.* 2017; 9; eaan6566.
3. Yamamoto Y, Gotoh S, Korogi Y, et al. Long-term expansion of alveolar stem cells derived from human iPS cells in organoids. *Nat Methods.* 2017; 14; 1097-1106.
4. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319; 525-32.
5. Nasser MW, Datta J, Nuovo G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 2008; 283; 33394-405.
6. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2016; 48; 607-16.
7. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 511; 543-50.
8. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012; 489; 519-25.
9. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* 2019; 576; 149-157.