

論文の内容の要旨

論文題目: Basal-like 乳癌モデルマウスにおけるゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用した癌抑制遺伝子探索系の確立

氏 名 坂根 康太

【背景】

乳癌は日本においても女性の罹患率第一位の疾患であり、比較的若年の女性にも見られることから、患者の QOL(Quality of Life)の向上のために重要な研究対象である。乳癌はその遺伝子発現パターンによりいくつかのサブタイプに分類され、中でもトリプルネガティブ乳癌に分類される Basal-like 乳癌(BLBC)は、他のサブタイプと比べて悪性度が高く、予後が悪いことが知られている。それにも関わらず、他のサブタイプで有効なホルモン治療やハーセプチンなどが効かず、有効な治療標的が見つからないため、新規治療標的の発見や発癌メカニズムの解明が待たれている。そこで私は *in vivo* の BLBC の発癌モデルを用いることで生理的環境下での発癌メカニズムのより詳細な理解や新規治療標的の発見が可能なのではないかと考え、BLBC のモデルマウスとしてメスの C3(1)/SV40Tag マウス(C3 マウス)を用いて、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを利用した *in vivo* スクリーニングを考案した(Fig. 1)。C3 マウスでは、ラットの C3 ペプチドのプロモーターの制御下で SV40 T 抗原が発現するため、7-8 週齢で乳腺上皮細胞に SV40 T 抗原を発現する。T 抗原は p53 や Rb などの癌抑制因子を不活化するため、発癌が可能な状態とはなっているが、実際に腫瘍の形成が起こるのは 20 週齢前後である。このことから、その 12-14 週間の間に、様々な変異がゲノムに蓄積することで腫瘍形成が起こると推察され、実際に K-ras の変異などが既に報告されている。BLBC は Luminal Progenitor 細胞が癌化することで生じると考えられているため、この細胞を含む乳管を形成する乳腺上皮細胞(Luminal 細胞)を対象に CRISPR/Cas9 システムに基づいた gRNA ライブラリーを用いて遺伝子のノックアウトを行い、gRNA の発現カセットのゲノム DNA への挿入や癌化までの期間の変化などを指標として、生体内の発癌過程に沿ったスクリーニング系の確立を目指した。

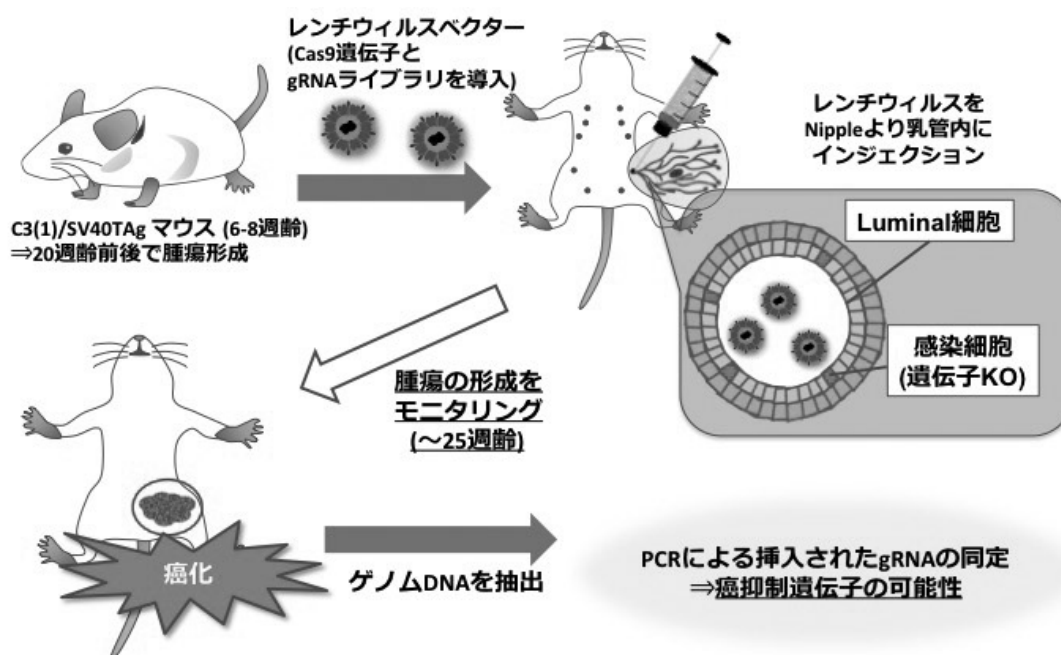


Fig. 1 CRISPR/Cas9システムを用いたC3マウスにおける*in vivo*スクリーニング

【結果】

(1) レンチウィルスの Intraductal injection により乳腺上皮細胞への *in vivo* 遺伝子導入が可能である。

In vivo 遺伝子導入を確立するため、初めに蛍光タンパク質 Venus 遺伝子を導入するレンチウィルスを Nipple より乳管内にインジェクションした。その結果、乳管構造に沿って Venus の蛍光が確認された。また、この遺伝子導入が乳腺上皮細胞特異的であるかを確認するため、フローサイトメトリーによる解析を行った。表面抗原を利用した分画により、乳管を形成する Luminal 細胞 (CD24^{high}, CD49^{f+}) や Basal 細胞 (CD24⁺, CD49^{f^{high}}) を分画できるが、それら乳腺上皮細胞特異的に Venus の蛍光が検出された。このことから、レンチウィルスを乳管内にインジェクションすることで、1-5%程度の Luminal 細胞への遺伝子の導入が可能であることが示された。従って、1箇所乳腺にインジェクションを行うことによって、10³-10⁴個程度の Luminal 細胞に遺伝子導入が可能であると見積もられた。使用する gRNA ライブラリーのサイズが 65000 種類程度であることを考慮すると、十分スクリーニング系を実施可能であると考えられる。

(2) 癌抑制遺伝子 Pten を対象とする gRNA の導入により、腫瘍形成が行われた。

次に、Fig.1 のスクリーニング系の実施可能性について検討するために、既知の癌抑制遺伝子 (Pten, Inpp5j, Rnd1, Rasa1) を対象とする gRNA をそれぞれの遺伝子につき 3 つずつ設計した。これらの gRNA 発現カセットを組み込んだベクター 12 種類をすべて混ぜ合わせてレンチウィルスを作製し、超遠心を用いてウィルスの濃縮を行うことで高力価のレンチウィルスが得られた。このウィルスを 6-8 週齢のメスの C3 マウスに対して乳管内へのインジェクションを行った (6 匹、28 乳腺)。この際、同様の操作により取得した同程度の力価の EGFP 遺伝子導入ウィルスをあらかじめ乳管内にインジェクションを行い、Luminal 細胞の 1% 程度への感染を確認している。その後、25 週齢まで週 2 回の触診により、腫瘍の形成をモニタリングした。これにより形成されたすべての腫瘍 (21 個) よりゲノム DNA を抽出し、ゲノム上に挿入された gRNA 発現カセットを対象とするプライマーセットを用いて PCR を行ったところ、バンドが検出された腫瘍が 3 つあった。これらのバンドを切り出し、プラスミドベクターに組み込んだ後に、挿入されていた gRNA 配列をシーケンス解析により同定した。この際、どの腫瘍においても Pten を対象とする gRNA が検出されたため、C3 マウスの発癌過程に Pten の寄与が示唆された。

そこで、Pten 単独のノックアウトによって腫瘍形成が行われることを実証するために、Pten を対象とする gRNA 3 種類のみを混ぜ合わせてレンチウィルスを作製し、同様に C3 マウスに対して乳管内へのインジェクションを行った (6 匹、30 乳腺)。形成された腫瘍 (37 個) のうち、10 個において gRNA 発現カセットのゲノムへの挿入が確認された。それらの gRNA の発現カセットが見出された腫瘍 10 個について、ダイレクトシーケンスによって標的部位への変異の導入を確認したところ、7 個の腫瘍において、標的部位への変異が確認され、Pten がノックアウトされていた。

一方、negative control の実験として、マウスのゲノムを標的としない gRNA (non-targeting gRNA; ntgRNA) を 3 種類設計し、これを用いてレンチウィルスを作製し、同様に C3 マウスに対して乳管内へのインジェクションを行った (6 匹、26 乳腺)。形成された腫瘍 (14 個) については、PCR によって解析を行ったが、gRNA 発現カセットのゲノムへの挿入は見られなかった。このことは、Pten が C3 マウスの発癌過程において重要な役割を担っていることを支持する結果である。

以上のように、レンチウィルスの Intraductal injection によって、CRISPR/Cas9 システムを乳腺上皮細胞に導入でき、目的の遺伝子のノックアウトが達成される系を確立することができた。

(3)gRNA ライブラリーの導入によって、miRNA を対象とする gRNA が検出された。

最後に、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子のノックアウトにより腫瘍形成を引き起こす系の確立が出来たため、同様の手法で *in vivo* スクリーニングを試みた。Feng Zhang らのグループが開発した GeCKO(Genome-scale CRISPR Knock-Out)ライブラリーを用いて、これまでと同等の力価のレンチウイルスを作製し、マウスの乳管内にインジェクションを行った(10 匹、48 乳腺)。25 週齢までに得られたすべての腫瘍(28 個)について、これまでと同様の解析を行ったところ、バンドが検出された腫瘍があり、miRNA を対象とする gRNA が検出された。この miRNA が実際に癌抑制遺伝子として働いているかについては今後検証を行っていく必要があると考えている。

【まとめと考察】

私は本研究でレンチウイルスの Intraductal injection により乳腺上皮細胞特異的に CRISPR/Cas9 システムを導入し、*in vivo* で遺伝子をノックアウトする手法を開発した。これにより、発癌における遺伝子の機能を細胞間の相互作用を保ったまま生理的環境下で評価できると考えられる。これまで PI3K/AKT シグナルを負に制御する PTEN が BLBC において、高頻度で発現が抑制されているという報告はあったが、今回開発した評価系によって初めて BLBC のモデルマウスという実際の生体内の発癌過程における Pten の寄与を示唆することができた。同程度の力価のウイルスを用いているにも関わらず、ntgRNA を導入したマウスに形成された腫瘍に gRNA の挿入が確認されなかったことは、Pten の欠失が発癌の原因であることを強く示唆している。一方で、gRNA ライブラリーを導入した際に、gRNA が挿入された腫瘍があまり多く得られなかった背景には、レンチウイルスの感染効率が不十分であった可能性が考えられる。この点については、レンチウイルスのパッケージングベクターの比較検討によって改善が可能であると考えている。また、細胞に Cas9 タンパク質を発現させることで、免疫応答が起こるといった報告があるため、それにより感染細胞が排除されてしまい、想定していたよりも感染した細胞の生存率が低下していた可能性が考えられる。この点については、C3 マウスを Cas9 のノックインマウスと掛け合わせ、Cas9 タンパク質をあらかじめ発現させておき、免疫寛容を獲得させることで克服が可能であると考えられる。さらに、Cas9 のノックインマウスを利用すれば、レンチウイルスベクターに Cas9 遺伝子を組み込んでおく必要がなくなるため、プラスミド長を短縮することができる。これにより、感染効率の更なる上昇を見込むことができるだろう。今後これらの改善により、より精度の高いノックアウトスクリーニングも可能になると考えられ、BLBC の発癌メカニズムの解明や新規治療標的の発見を目指す予定である。