

# 大腸がん特異的膜タンパク質 SLC6A6 ノックアウト細胞の作製とその性状解析

がん先端生命科学分野 47-136334 山崎 聡子

指導教員 松村保広

## 【背景・目的】

大腸がんは罹患数・死亡数の上位に挙げられるがんである。現在行われている大腸がんの主流の薬物療法は、複数の抗がん剤を組み合わせで行われるが、その治療効果は不十分で、副作用の問題もある。そこで、薬物療法の有効性を高め、副作用が少ない新規治療法が求められている。

当研究室では過去に大腸がん細胞と健常人の大腸剥離細胞を比較することで、大腸がん特異的分子としてタウリントランスポーター-SLC6A6 (Sodium- and chloride-dependent taurine transporter: TauT) を同定した。さらに、short hairpin RNA を導入することで SLC6A6 の発現を減少させたノックダウン(KD)細胞とコントロール細胞を使用して、薬剤感受性、ABC トランスポーターの発現量、薬物代謝酵素の発現量を比較した。その結果、SLC6A6 が大腸がん細胞の生存因子として抗がん剤の多剤耐性に働いていることが明らかになった。しかし、細胞株と薬剤との組み合わせによっては薬剤感受性の変化にも差がみられた。KD の場合は遺伝子発現が残っているため、ある状況下で何らかの代償作用が働いた可能性を否定することができない。

そこで本研究では、新たに CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子ノックアウト細胞の作製を試みた。CRISPR/Cas9 システムは RNA 誘導型ヌクレアーゼにより、ゲノム上の任意の位置を 2 本鎖切断するというゲノム編集ツールである。従来のゲノム編集ツールと比較して簡便で安価という利点がある。本研究の目的は、ノックアウト細胞を取得し、wild type の細胞と比較することで、SLC6A6 の機能をさらに解析することである。

## 【結果・考察】

CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト細胞を作製するにあたり、2 本鎖切断の標的部位を 2 ヶ所設計し、vector を作製した(図 1)。また、標的部位に対応する HR targeting vector を作製し (図 2)、

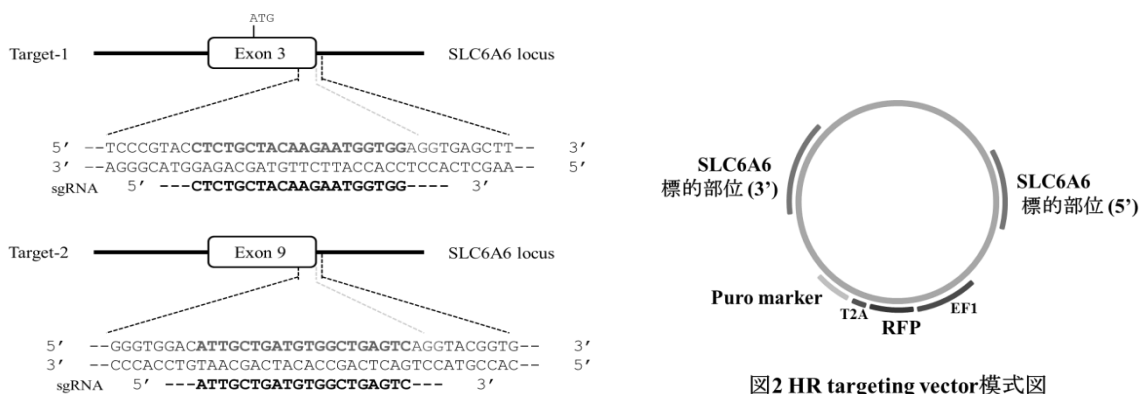


図1 標的部位の設計

図2 HR targeting vector 模式図

Cas9 vector による 2 本鎖切断部位に、RFP 発現および Puromycin 耐性遺伝子をノックインした細胞の作製を試みた。HT29 細胞に対して、Cas9 vector と HR targeting vector の Co-transfection を行った後、約

2週間 Puromycin によるセレクションをし、シングルクローン化の後にゲノムの確認を行った。その結果、Target-1 においては 52 クローン中 1 クローンで、Target-2 では 45 クローン中 8 クローンで変異が確認できた。いずれも、相同組換えによる HR targeting vector のノックインは生じていなかったが、Cas9 vector は働いており、非相同末端結合による 2 本鎖切断後の修復エラーが起こっていた。このうち、ホモ型変異が生じていた 6 クローン (Target-1 : 1 クローン、Target-2 : 2 クローン) の mRNA の確認を行った。Wild type の mRNA は見つからず、変異が生じていることを確認した。

次に、取得した 6 クローンを用いて、フルオロウラシル、ドキソルビシン、SN-38、オキサリプラチンに対する薬剤感受性を確認した。

Wild type の細胞と比べると、薬剤感受性が上昇していた(図 2)。標的部位、および使用薬剤によっても感受性の差が認められた(図 3)。

SLC6A6 の薬剤感受性への影響について、機能ドメインによる違いがあることが示唆された。

今回、薬剤感受性に使用した細胞には、HR targeting vector がランダムインテグレーションしていることによるオフターゲット効果が生じている可能性がある。そこで、GFP-linked Cas9 vector を用いてノックアウト細胞の作製を試みた。この方法は HR targeting vector のランダムインテグレーションを回避でき、GFP 発現の有無による細胞のセレクションが可能になったことにより、スクリーニング効率があがることが期待できる。GFP-linked Cas9 vector の transfection 後、シングルクローン化し、ゲノムの確認を行ったところ、Target-1 では 8 クローン中 5 クローンで、Target-2 では 9 クローン全てでゲノムの変異が確認できた。Target-1 の 5 クローンについて mRNA の確認を行ったところ、Wild type の mRNA は見つからなかったが、フレームシフト変異が予想されるものは 1 クローンのみであった。

### 【結論】

Cas9 vector と HR targeting vector を用いて、SLC6A6 のゲノムおよび mRNA に変異が生じた細胞を取得した。これらの細胞では薬剤感受性が上昇していることが確認できた。また、標的部位を 2 ヶ所設計したことによって、SLC6A6 の薬剤感受性への影響について、機能ドメインによる違いがあることが示唆された。しかしながら、今回取得した細胞には HR targeting vector のランダムインテグレーションによるオフターゲット効果の可能性という問題点がある。そこで現在、GFP-linked Cas9 vector を用いたノックアウト細胞の取得に取り組んでいる。また、LC-MS/MS を用いたタンパク質発現の有無の確認方法の確立に取り組んでいる。

本研究で得た知見を活かし、ノックアウト細胞を取得することで、薬剤耐性機構に強く関与していると思われる SLC6A6 の機能が明らかになることが期待される。

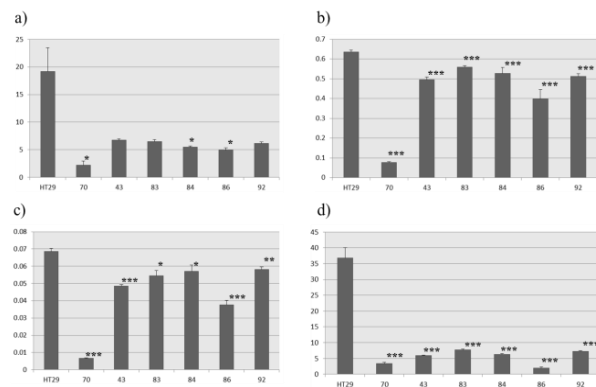


図 2 各細胞における IC<sub>50</sub>  
a) フルオロウラシル b) ドキソルビシン c) SN-38 d) オキサリプラチン  
\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001  
Target-1 : クローン70、Target-2 : クローン43、83、84、86、92

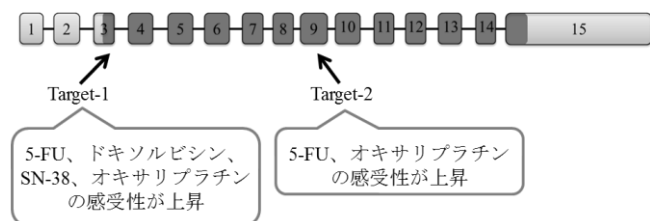


図3 標的部位による薬剤感受性の比較