

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research And Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) マウスモデルを用いた消化器がんと脳腫瘍の悪性化に関わる遺伝子の同定と機能評価
(英語) Identification of driver genes promoting colorectal and brain cancer using mouse models
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 助教 武田はるな
(英語) Cancer Research Institute, Kanazawa University, Assistant Professor, Haruna Takeda
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) マウスモデルを用いた消化器がんの転移に関わる遺伝子の同定とドライバー遺伝子機能検証
(英語) Identification and validation of driver genes promoting colorectal cancer metastasis using mouse models
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 助教 武田はるな
(英語) Cancer Research Institute, Kanazawa University, Assistant Professor, Haruna Takeda
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 脳腫瘍マウスモデルを用いたがんの遺伝学的不均一性に関与するドライバー遺伝子の同定
(英語) Identification of the driver genes regulating tumor heterogeneity in brain cancer
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 特任講師 高祖秀登
(英語) Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Project Senior Assistant Professor, Hideto Koso

II. 成果の概要（総括研究報告）

がん組織が保持する数多くの遺伝子変異の中にはドライバー遺伝子とパッセンジャー遺伝子が混在しており、両者の区別をつけることは困難な状況にある。本研究では、(A)脳腫瘍と消化器がん形成に関与するドライバー遺伝子のがん化機能評価を行うこと (B)遺伝学的不均一性ががんの悪性化過程にどのように関与しているか解明することを目的とし、本年度は、がん化機能の評価するための実験系の確立を目標とした。

(A) 武田はるな（金沢大学・がん進展制御研究所）：平成 28 年度は、マウス消化管上皮細胞よりオルガノイド培養を樹立し、この細胞にて遺伝子ノックアウトを行うための実験系の確立を行った。オルガノイド培養は正常細胞の形質を保持した状態で培養できるため、がん化能評価に適した細胞である。この細胞に CRISPR-Cas9 システムを導入することで、がん抑制候補遺伝子のノックアウト細胞を作成し、不死化細胞樹立のための条件検討を行った。これまでに、評価を行うための候補遺伝子の抽出、これら遺伝子を標的としたレンチウイルスの gRNA ライブラリーの作成、Cas9 を恒常的に発現するオルガノイド細胞の樹立を終えた。現在は gRNA を Cas9 発現細胞に導入してノックアウト細胞を作成し、不死化細胞の樹立を行っている。さらに、大腸がんのモデルマウスに形成される良性腫瘍から樹立した腫瘍上皮細胞のオルガノイドを用い、候補遺伝子のノックアウト細胞を作成している。正常細胞と腫瘍細胞において候補遺伝子をノックアウトした場合に、表現型の違いを比較することで遺伝子が腫瘍形成の初期段階に機能しているのか、悪性化の段階に機能しているのかを判断する。

高祖秀登（東京大学・医科学研究所）：平成 28 年度は、複数の遺伝子に対する脱制御により、神経幹細胞をグリオーマ幹細胞へと形質転換できるマウスモデルを用いて、腫瘍内遺伝学的不均一性を生体で再構築するために、遺伝学的に異なるクローンを異なる蛍光で標識する手法の開発に取り組んだ。また候補遺伝子の機能解析について、*in vitro* での増殖促進能の評価を開始した。平成 29 年度は、*in vitro* での検討を進め、増殖を促進するような候補遺伝子に対しては、*in vivo* での評価を行う。

(B) 武田はるな（金沢大学・がん進展制御研究所）：遺伝学的に不均一な消化管上皮細胞集団を樹立するために、SB トランスポゾン挿入変異システムを用いる。SB トランスポゼースと SB トランスポゾンの二つの要素を持つマウスを入手し終え、消化管上皮幹細胞特異的に Cre を発現するマウスとの交配を進めている。

高祖秀登（東京大学・医科学研究所）：平成 28 年度は、SB 挿入変異誘発により小脳髄芽腫を形成するマウスモデルを用いて、腫瘍の初期病変と進行病変を単離した。これらの腫瘍からゲノムを抽出し、トランスポゾン挿入部位の近傍を PCR で増幅し、次世代シーケンサーで解析した。平成 29 年度は、次世代シーケンサーのデータを用いて、挿入変異とドライバー候補遺伝子の同定に進む予定である。

The cancer tissue is genetically heterogenous and carries numerous gene mutations. However, sorting out infrequently mutated driver genes from passenger genes is still challenging. Our research aims are (A) to validate candidate cancer genes involved in cancer development in the gastrointestinal and brain, and (B) to understand how genetic heterogeneity contributes to malignant cancer progression. The goal of our research in 2016 was to establish the experimental system.

(A) Haruna Takeda (CRI, Kanazawa Univ., Assistant Professor): To validate the candidate tumor suppressor genes in the GI tract, genes commonly mutated between human and mice, especially for which are likely to function as tumor suppressors, are going to be knocked out in the organoids established from mouse intestinal epithelial cells. I introduced a plasmid encoding a Cas9 nuclease to establish Cas9 expressing organoids. I also generated the lenti virus gRNA library targeting a set of candidate tumor suppressor genes and transduced to the Cas9 expressing organoids. Organoids expressing Cas9 and gRNA are sorted to enrich mutant organoids then will be transplanted to mice for tumor forming assay in vivo.

Hideto Koso (IMS, Univ. of Tokyo, Project Senior Assistant Professor): Last year, I reconstituted tumor heterogeneity in a mouse model of glioma by labeling genetically distinct clones with different fluorescent proteins. I also started functional analyses of candidate cancer genes in vitro. If growth-promoting effects were validated, such candidates will be further analyzed in the in vivo setting.

(B) Haruna Takeda (CRI, Kanazawa Univ., Assistant Professor): I will use the Sleeping Beauty transposon based insertional mutagenesis system to generate the genetically heterogenous cell population of intestinal epithelial cells. The sleeping beauty system is composed of a SB transposase and SB transposons. Mouse carrying these two components are being generated by mating.

Hideto Koso (IMS, Univ. of Tokyo, Project Senior Assistant Professor): To identify the genes involved in progression of brain cancer, I induced brain cancer by using SB transposon mutagenesis. Early and late tumor lesions were collected. Genomic regions adjacent to SB transposons were PCR amplified and analyzed by Illumina sequence. Candidate driver genes will be identified by bioinformatics analyses.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Suzuki-Kerr H, Baba Y, Tshako A, Koso H, Dekker JD, Tucker H, Kuribayashi H, Watanabe S. Forkhead box protein P1 is essential for lens epithelium transition to the fiber cells during development but does not play roles for retinal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017, 58, 1916-29

2. Kuribayashi H, Tsuchako A, Kikuchi M, Yoshida N, Koso H, Watanabe S. Role of transcription factor Tgif2 in photoreceptor differentiation in the mouse retina. *Experimental Eye Research*. 2016, 152, 34-42
3. Koso H, Tsuchako A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. *Glia*. 2016, 64, 2005-24

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 第75回日本癌学会学術総会 「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」口頭（招待公演）、武田はるな、2016年10月6-8日 横浜・パシフィコ横浜, 国内
2. 第2回AMEDがん若手研究者ワークショップ 「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」（ポスター発表）、武田はるな、2016年11月29-30日 東京・晴海グランドホテル
3. AMED-Alberta workshop 「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」（ポスター発表）、武田はるな、2017年2月24-25日 ハイアットホテル・カルガリー・アルバータ州・カナダ
4. マウス神経系における細胞競合の検討, 口頭, 高祖秀登, 新学術領域 細胞競合・ダイニングコード 合同若手ワークショップ, 2017/1/18, 国内.
5. Cancer Gene Discovery Using Transposon-based Insertional Mutagenesis, ポスター, 高祖秀登, 渡辺すみ子, 新学術領域 先進ゲノム支援 国際シンポジウム, 2017/1/10, 国内.
6. グリオーマにおける新規がん抑制遺伝子 LARP4B の同定, 口頭, 高祖秀登, 第75回日本癌学会学術総会, 2016/10/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし