

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 自己ゲノム編集機構を利用した安全性の高いゲノムデザイン技術の開発  
(英語) Development of highly safe genome design technology using self-genome editing system

研究開発担当者 (日本語) 大学院生物資源産業学研究部 准教授 間世田英明  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Bioscience and Bioindustry, Tokushima  
University Associate Professor Hideaki Maseda

実施期間： 平成28年12月12日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) PODiR システムによるゲノム編集のヒトがん細胞への適応  
開発課題名： (英語) Genome editing by PODiR system to human cancer cells

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人徳島大学 先端酵素学研究所 プロテオゲノム研究領域  
教授 片桐 豊雅  
所属 役職 氏名： (英語) Division of Genome Medicine, Institute for Genome Research, Tokushima  
University, Professor Toyomasa Katagiri

## II. 成果の概要（総括研究報告）

<和文>

一般に、遺伝子治療を目的として考えた場合、そのゲノムの改変には、現時点では CRISPR/CAS9 の利用が考えられる。しかしながら CRISPR/Cas9 システムを遺伝子療法へ利用するには、大きな問題点が幾つかあり、特に①目的遺伝子以外が改変されてしまうオフターゲットの問題 → 重大な副作用が生じる ②外来ヌクレアーゼ(タンパク質)を細胞に発現導入しなければならない問題 → 個体レベルでタンパク質を特定の細胞だけに導入・発現させることが困難 などをクリアした安全性を担保したゲノム編集法が必要である。申請者らは、生物の中に自己ゲノム編集機構 PODiR システムが存在していることを見出し、PODiR システムをミミックした核酸の導入のみで、意図した配列を改変（組換えでない）できることを、細菌細胞で明らかにした。本研究では、動物細胞にも存在が確認された PODiR システムを利用して、核酸導入のみで意図した配列の改変を動物細胞およびがん細胞で行うことを目標にしている。

i) GFP をコードする遺伝子内に、PODiR 配列を形成するような塩基（P 配列）を導入したものと、PODiR を形成しないランダムな塩基（N 配列）を挿入した2種の人為的に破壊された GFP 遺伝子を作成し、ii) それを動物細胞のゲノムに挿入可能なベクターに導入し、アッセイ細胞の構築をほぼ終えた。アッセイを行える段階にきている。

すなわち、非 PODiR の配列（任意の配列：8mer）を GFP 遺伝子内に導入して、機能を欠損した GFP 遺伝子カセット non-PODiR-1se を作成し、それを動物細胞用のベクターである pCDH-CMV -EF1-RFP+puro に導入した。導入されたベクター pCDH-CMV-EGFP-nonPOD-1se-polyA-EF1-RFP+puro を、リポフェクション試薬を用いて、HEK293T 細胞に導入した。導入の有無は、puromycin 0.25, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む血清培地で形質導入した HEK293T を培養し、4-6 日後に新しい同上の培地に継代培養することでゲノムに nonPODiR-1se カセットが導入された細胞群を作成した。既に、同方法により PODiR の破裂の導入により機能を破壊した PODiR 型 GFP カセットの作成は終了しており、同様に、HEK293T 細胞に導入を完了させ、形質導入された細胞群の作成を完了している。

一方、分担者である片桐らは、H28 年度、がん細胞のみで発現し、かつ、がん細胞の増殖・生存に必須である遺伝子 GALNT6 および BIG3 を、RNA 干渉法で抑制した時、最も増殖抑制効果の認められるがん細胞株を選定することを行っている。次に、間世田のグループと共同で、実際に PODiR システムによって、これらの細胞の GALNT6 および BIG3 遺伝子を破壊することで、がん細胞をより効率的に増殖が抑制されるのか、確認することを計画していた。H28 年度は iii) 乳がん細胞株の選定と iv) それら遺伝子のどの領域が最も効率的に破壊することが可能なのか配列デザインの検討を行う予定で検討を進め、iii) として、最も細胞増殖抑制効果が顕著であった細胞株として、乳癌細胞株を選定し終え、iv) として、破壊に最適な位遺伝子領域の選択を行っている。

<英文>

In general, when considering gene therapy, the use of CRISPR / CAS 9 is considered at the present time for genome editing. However, there are several major problems in utilizing the CRISPR / Cas9 system for gene therapy, especially  
① off-target problem ; non-target genes are altered → serious side effects occur  
② Introduction and expression of exogenous nucleases (proteins) in cells → It is necessary to have a genome editing method ensuring safety such as overcoming the difficulty of introducing and expressing Cas9 protein to only specific cells. Applicants found that the self genome editing system, PODiR system, is present in most living organisms and that it is possible to modify (not recombination) the intended sequence only by introducing nucleic acids that mimicked the PODiR system in bacterial cells. In this study, we aim to use the PODiR system, which was confirmed to be present in animal cells, to carry out the modification of the intended sequence in animal cells and cancer cells only by introducing nucleic acids.

That is, a non-PODiR sequence (arbitrary sequence: 8 mer) was introduced into the GFP gene to prepare a deficient GFP gene cassette non-PODiR-1 se, which was inserted into pCDH-CMV -EF1-RFP + puro. The introduced vector pCDH-CMV-EGFP-nonPOD-1 se-polyA-EF1-RFP + puro was introduced into HEK 293T cells using lipofection reagent. The introduction was confirmed by culturing HEK 293T transduced in serum medium containing puromycin 0.25, 0.5  $\mu\text{g}$  / ml, subculturing the same on the same medium after 4-6 days, and a cell group into which the cassette was introduced was prepared.

The preparation of PODiR type GFP cassette which had destroyed the function by introducing PODiR by same method has already been completed and introduction is also completed in HEK 239T cells and preparation of the transduced cell group is completed in the same manner.

On the other hand, Katagiri et al. select cancer cell lines which show the most proliferative effect when GALNT6 and/or BIG3, which are expressed only in cancer cells and are essential for proliferation and survival of cancer cells, are suppressed by RNA interferometry, and then make sure that destroying these GALNT 6 and BIG 3 genes by the PODiR system lead to suppress the growth of the cancer cells more efficiently. In this year, iii), the breast cancer cell lines MCF-7 and SKBR 3 were selected as cell lines with the most prominent cytostatic effect and iv) sequence design of which region of these genes can be most efficiently destroyed have selected.

### 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 件、国際誌 件）  
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
採択してから期間が短いため、なし

(4) 特許出願  
なし