

CRISPR-Cas9 system を用いた膵臓癌 *KRAS* 遺伝子編集治療

東北大学大学院 医学系研究科 病態病理学分野

廣 瀬 勝 也

I 要 旨

膵臓癌は早期の段階での発見が困難な上に早期の外科治療を除いて有効な治療法はなく、癌の中でも非常に予後不良な疾患の1つである。*KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* は膵臓癌の形成、進展に大きく関与している遺伝子として知られており、中でも *KRAS* は膵臓癌の全症例の 90% 程度で変異を伴っており、その機能亢進性変異が膵臓癌発生進展の driver として機能していると考えられる。本研究では、*KRAS* の機能亢進性変異が codon12 に比較的限局していることに着目し、CRISPR-Cas9 system を用いて変異遺伝子を特異的に編集することが有効な治療法となる可能性について検討するため、膵臓で頻繁に認められる数種類の *KRAS* 変異に特異的に作用するガイド RNA と Cas9 を同時に発現するアデノウイルスベクターを構築した。今後、本研究で構築した変異 *KRAS* 遺伝子特異的 CRISPR-Cas9 アデノウイルスベクターによりヒト膵臓癌細胞株、in vivo マウスモデルを用いてその有効性を検証し、本手法が膵臓癌の根本的治療への一助となることを実証する。

II 目 的

胃癌や大腸癌など、多種の癌が早期の診断・治療や有効な治療薬の開発により予後を改善している一方で、膵臓癌に対する有効な対策は未だ模索中である。2018 年がん統計予測（国立がん研究センター）では膵臓癌は罹患数 4 万人、

死亡数 3 万 4900 人で、2016 年のがん死亡数においても臓器別癌死亡数第 4 位であり、5 年生存率は 7.9-7.5% と他臓器のがんと比較しても極めて低い数値である。また、年次推移を見ても肺癌も含めた他臓器癌は年齢調整死亡率が減少傾向にあるのに対して、膵臓癌は横ばいから増加傾向にある。根本的な治療は早期の外科切除であるが、超音波内視鏡や MRCP などの検査技術が発展してきても有効なスクリーニング方法は確立されていない。昨今注目されている早期の癌病変と言われている上皮内癌に関しても、その全てが進行癌となるのか、また、本当に全ての膵臓癌が膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) を経て浸潤癌になるのかは明らかではなく、早期発見・治療は困難な現状にある。

膵臓癌の遺伝子学においては、Big four と呼ばれる *KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* が発見され、中でも *KRAS* は膵臓癌の 90% 近くで変異を伴い、そのうちの多くが codon 12 の変異であることが知られている。膵臓癌の進行に影響する遺伝子も複数発見されてきているが、未だ治療や早期発見に結びつく実用的な手法は提唱されていない。我々は膵臓癌に最も高頻度に認められ、変異部位が比較的限られている *KRAS* の変異に対して、CRISPR-Cas9 による遺伝子編集により変異遺伝子の特異的破壊あるいは野生型との置換を行い膵癌細胞の生存増殖を阻止することで膵臓癌の根本的な治療を可能とすることを目的として研究を進めている。容易に根治に至らないとしても、膵臓癌が *KRAS* の復帰により如何に影響を受けるか観

察し、*KRAS* の膵臓癌における働きを解明することで、将来の膵臓癌治療の有用な手立てとなると期待される。

III 方法

1 CRISPR - Cas9 ベクターの構築

ガイド RNA 挿入カセットおよび Cas9 発現配列を含む pCas - Guide CRISPR Vector (Origene) を用いて変異 *KRAS* 遺伝子配列もしくは変異近傍の野生型配列を標的とするガイド RNA をデザインし挿入した。

2 アデノウイルスベクターの構築

Adeno - X™ Adenoviral system 3 (Clontech) を用いてアデノウイルスベクターを作製した。上述の手法で得られた CRISPR/Cas9 system を含んだ DNA を pAdenoX ベクターへ導入する前に、15 塩基対の pAdenoX 相同部分を DNA の両端に付加した挿入配列を作製するため、primer を設計し PCR を行った。そうして得られた PCR product を NucleoSpin Gel and PCR Clean Up (Anatrace Products LLC) を用いて精製した後に、In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech) を用いて pAdenoX - PRLS - ZsGreen1 へ導入した。トランスフォーメーションには Stellar™ Competent Cells (Clontech) を用い、増殖した Competent Cells からのアデノウイルス DNA の抽出には Nucleobond Xtra Plasmid Midi Kit (Anatrace Products LLC) を用いた。抽出物が目的としている Recombinant Adeno - X プラスミドであることを確認するため、手順書に記載されている Xho I、Nhe I に加えて、EcoR I を用いた制限酵素処理と、サンガーシーケンスによる挿入部分の配列の確認を行った。続いて Recombinant Adeno - X プラスミドベクターを 293 細胞へトランスフェクションさせるために Pac I による制

限酵素処理を行い、CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech) を用いてトランスフェクションを行った。この際、cytopathic effect (CPE) が確認されなかった 293 細胞に関しては 10 日間程度でいったん回収・遠心し、PBS に拡散した後にドライアイスで冷やしたエタノール内で 4-5 回凍結融解を繰り返して、得られた溶解液を再度 293 細胞へ付加しトランスフェクションを繰り返した。

3 293 細胞培養

293 細胞培養には Minimum Essential Medium Eagle with Eagle's Salt (Sigma - Aldrich) に 10 % Fetal Bovine Serum (Sigma - Aldrich) を溶解させたものを培地として用いた。0.5mM EDTA - PBS 処理にて接着細胞を遊離させ回収し、適宜継代を行った。

IV 結果

1 CRISPR - Cas9 ベクターの構築

Cas9 発現配列を含む pCas - Guide CRISPR Vector (Origene) を用いて、プロトコルに準拠して変異遺伝子配列もしくは変異近傍の野生型配列を標的とする guide - RNA をデザインし挿入した。*KRAS* codon12 の部分の配列を標的とし、数種類の変異について構築した。

2 アデノウイルスベクターの構築

pAdenoX 相同部分を付加するために PCR を行い、Competent cell を用いてトランスフォーメーションを行った。LB 寒天培地内に増殖したコロニーを採取し PCR で pAdenoX - PRLS - ZsGreen1 へ導入されていることを確認し増幅した (図 1 A)。さらにその後制限酵素処理 (図 1 B) とサンガーシーケンスにより想定したコスミドベクターが作製できていることを確認した。

上記のコスミドベクターを 293 細胞へトラ

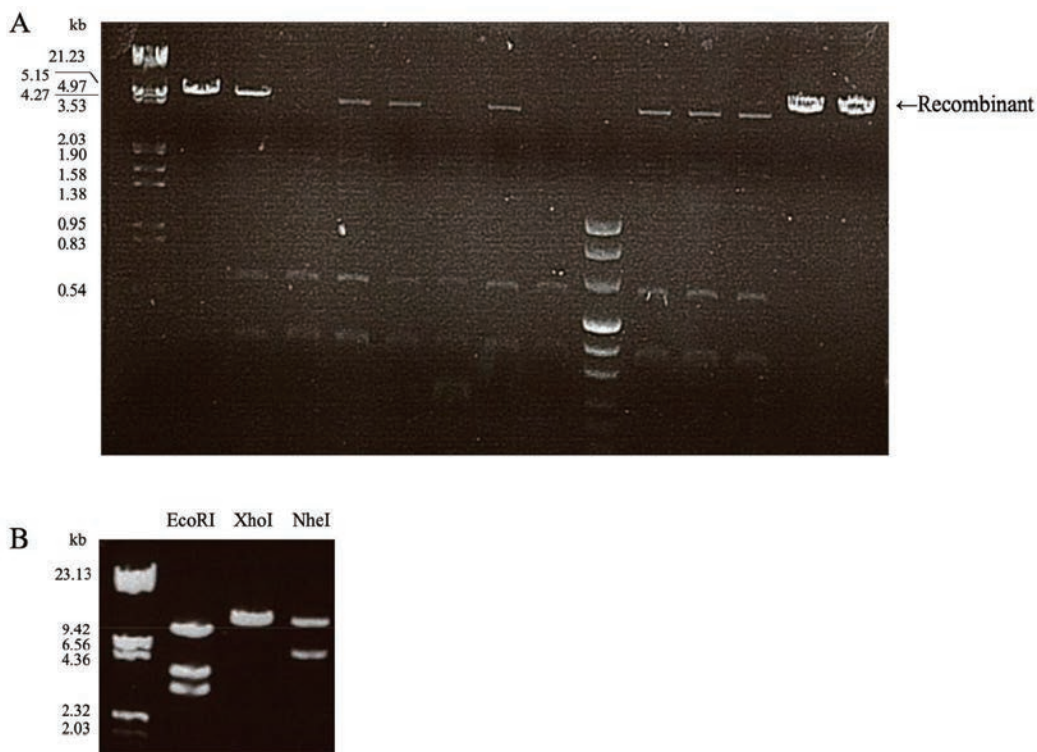


図 1

A : Competent cells を用いた transformation 後の colony PCR 結果
B : Cosmid vector に制限酵素処理を行った結果

ンスフェクションを行うことによりアデノウイルスに組み替えた。CPE の観察によりトランスフェクションを確認した。

V 考 察

2013 年に発表された CRISPR - Cas9 を応用したゲノム編集技術により異常遺伝子の根本的な修復が治療の選択肢として可能となりうることが示された。CRISPR - Cas9 は標的とする遺伝子配列と相同のガイド RNA に Cas9 が誘導され、genomic DNA 上の標的配列に二重鎖切断を生じさせる。切断された部位が non - homologous end joining (NHEJ) または homologous recombination (HR) により修復される。

NHEJ においては修復時の欠失のためフレームシフト変異が生じ遺伝子機能は失われる。HR の際は標的部位の 5'、3' と同様の配列をもつ断片を組み込むことができる。ガイド RNA 配列は PAM 配列の 5' 側に隣接する任意のゲノム領域を設定することができるため自由度は高く、また、PAM 配列を含む配列特異性が高いことから、off - target 効果がすくない。癌では oncogene の機能亢進性変異あるいは tumor suppressor gene の機能喪失変異が腫瘍の発生、進行に大きく関与しており、機能亢進性変異をもつ oncogene を標的とした CRISPR - Cas9 による NHEJ を生じさせることで異常な oncogene の機能を不活性化することができる。また、機能喪失性変異をもつ tumor

suppressor gene に対して HR により変異部位を野生型の配列と入れ替えることができる。Oncogene の変異部位を野生型配列と入れ替えることも可能と考えられ、本研究は *KRAS* の変異部位を標的として変異遺伝子の特異的破壊および野生型配列と入れ替えることで膵臓癌の根本的な治療を目指している。

本研究により CRISPR - Cas9 ベクターの構築、アデノウイルス化は問題なく終了した。現在ヒト膵臓癌細胞株へのアデノウイルスベクター投与、そしてマウスを用いた in vivo ヒト膵臓癌モデルに対するの投与を進めている。本研究において腫瘍の治癒や改善が認められれば、膵臓癌における非常に有用な治療の 1 つとなりうると期待される。

VI 結 語

膵臓癌は他の癌と比較しても非常に致死性の高い疾患であり、*KRAS* をはじめとして、その発生、進展に関連する遺伝子は同定されてきているが、根本的な治療法は未だ確立されていない。Driver gene である *KRAS* の遺伝子変異を修復することにより有効な治療法の 1 つとなる、もしくは膵臓癌の発生・進展機序を理解する有用な手立ての 1 つとなることを期待し研究を継続する。