

2021 年 3 月 31 日

一般財団法人 日本産業科学研究所  
宮地 尚 理事長殿

下記の通り一般財団法人日本産業科学研究所研究助成金の研究実績を報告致します。

東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野  
教授 古川 洋一

### 令和 2 年度研究助成 実績報告書

研究課題名：

大腸がん治療標的探索のための CRISPR-Cas9 スクリーニングシステムの開発

#### <研究背景>

Wnt シグナルは大腸がん・肝がんの他、様々なヒトのがん細胞で活性化しているシグナルであり、その活性化は細胞増殖の促進、幹細胞性維持、アポトーシスの回避などに関わることから、治療標的として注目されてきた。Wnt シグナルの制御には、 $\beta$ カテニンの分解や転写因子 TCF/LEF ファミリーの活性化に関わる様々な分子が同定されている。しかしながら、これまでそれらを標的とした治療薬の開発は成功していない。したがって、新たな Wnt シグナル制御分子の同定とその制御機構の解明が期待されている。

#### <研究目的>

大腸がんの新たな治療標的を同定するため、Wnt シグナルに着目し、そのシグナルを制御している新たな分子を同定することを目的とする。従来、同シグナルの活性は主に TOP-Flash レポーターアッセイにて測定されてきた。しかしレポーターアッセイを用いて活性を低下させる分子の探索は、多くの偽陽性が生ずることが示されている。そこで我々は、以前の研究で同定した Wnt シグナルの活性化により発現が転写レベルで抑制されている histidine ammonia-lyase (*HAL*) 遺伝子に着目した。その遺伝子のプロモーター内で Wnt シグナルにより調節されている領域を同定し、その領域を蛍光タンパク質 ZsGreen の上流にクローニングし、Wnt シグナル活性の抑制により Green 蛍光タンパク質が発現

する細胞株の樹立を第一の目的とする。さらに同細胞株に Cas9 と guide RNA を同時に発現するレンチウイルスベクター・ライブラリーを導入して、Green 蛍光タンパク質発現細胞を FACS にて回収し、導入された guide RNA の配列解析により、Wnt シグナルの制御に関わる新たな分子の同定を最終目的とする。

#### <研究結果>

*HAL* 遺伝子のプロモーター内の TCF/LEF 複合体に調節されている領域を ZsGreen 遺伝子上流にクローニングし、Wnt シグナルの抑制により Green 蛍光タンパク質が発現するプラスミドを作製した。次にこのレポータープラスミドを、Wnt シグナルが活性化している HepG2 細胞に導入した。これらの細胞の中から多数のシングルクローンを樹立し、通常の培養状態で Green 蛍光タンパク質の発現が低く、 $\beta$  カテニン siRNA で Wnt シグナルを抑制したときに Green 蛍光タンパク質を誘導される安定細胞株、HepG2-HAL-ZsGreen 細胞を樹立した。

現在この HepG2-HAL-ZsGreen 細胞に、Cas9 と guide RNA を同時に発現するレンチウイルスライブラリーを感染させ、Green 蛍光タンパク質発現細胞を解析中である。

#### <研究結果の意義と今後の展望>

本研究にて、Wnt シグナル活性化に関与している分子をスクリーニング可能な細胞株を樹立できた。今後 CRISPR-Cas9 を用いた網羅的なスクリーニングで同定された分子から、これまでに報告のない新たな制御分子を探索することは、Wnt シグナル抑制のための新たな標的分子の発見につながり、新規分子標的治療薬の開発に役立つものと期待される。

#### <研究業績>

[1] Yamaguchi K, Kasajima R, Takane K, Hatakeyama S, Shimizu E, Yamaguchi R, Katayama K, Arai M, Ishioka C, Iwama T, Kaneko S, Matsubara N, Moriya Y, Nomizu T, Sugano K, Tamura K, Tomita N, Yoshida T, Sugihara K, Nakamura Y, Miyano S, Imoto S, Furukawa Y, Ikenoue T. Application of targeted nanopore sequencing for the screening and determination of structural variants in patients with Lynch syndrome. *J Hum Genet.* 2021 May 6. doi: 10.1038/s10038-021-00927-9. Online ahead of print.