

CRISPR screening による大腸癌肝転移メカニズムの解明

MIT コーク 癌研究所 後藤沙織

研究経過、成果について

目的

派遣先の Yilmaz lab では、内視鏡下でのマウス大腸癌オルガノイド同所移植モデル、内視鏡下でのレンチウイルス局注による in vivo での CRISPR-Cas9 ゲノム編集モデルを確立し、大腸癌肝転移のプロセスをマウスモデルで再現することに成功した(Roper et al, Nat Biotechnol 2017)。本研究は、この新たな大腸癌肝転移マウスモデルを用い、肝転移のメカニズムの解明、さらには新たな治療標的の同定を目的として検証を行っている。

研究経過

Yilmaz Lab にて研究を開始した後、まず上記の内視鏡下マウス大腸癌オルガノイド同所移植の手法を習得した。

Apcflox/flox; KrasLSL-G12D; P53flox/flox マウス大腸癌オルガノイド(以下, AKP オルガノイドと記載)を内視鏡下にマウス大腸へ同所移植すると、浸潤性大腸癌を形成し 33%で肝転移を認める(Roper et al, Nat Biotechnol 2017)。Yilmaz lab ではこのモデルの肝転移巣、および原発巣からオルガノイドを樹立した後、繰り返しマウス大腸への同所移植を行い、100%の肝転移能をもつ肝転移由来 AKP オルガノイド、および0%の肝転移能をもつ原発巣由来 AKP オルガノイドのライブラリー樹立に成功した。申請者らはマウスへの同所移植は 1st, 2nd, 3rd rounds までを行い、各々の round で同時期に樹立された原発巣由来、肝転移巣由来オルガノイドを 3 biological replicates 作成した。

そして、これらのオルガノイドライブラリーの RNA-seq を行った。原発巣由来オルガノイドと比較して、肝転移由来オルガノイドで特異的に発現が変動している遺伝子群をいくつか同定した。さらに今後の計画としては、同オルガノイドライブラリーの ATAC-seq を行い、肝転移由来オルガノイドに特異的なオープンクロマチン領域を同定する。また、HOMER を用いたモチーフ解析により、これらのオープンクロマチン領域をターゲットとする転写因子の同定を試みる。これらの結果を統合することで、肝転移特異的なエピジェネティックな変化、およびその原因となる転写因子の候補を同定する(図 a)。別のアプローチとして、Paired Expression and Chromatin Accessibility (PECA) Method (Duren et al, PNAS, 2017)を用いて RNA-seq と ATAC-seq のデータを統合し、Cytoscape を用いたネットワーク解析を行い、中心となるハブ遺伝子を同定する(図 b)。これらの解析結果から、肝転移促進遺伝子、抑制遺伝子の候補リストを作成する。

図2 RNA-seqとATAC-seqの統合解析

