The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines
Author(s)	石橋, 亜衣里
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92031
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	石橋　亜衣里
論文題名 Title	A simple method using CRISPR-Cas9 to knock-out genes in murine cancerous cell lines (CRISPR-Cas9法を用いた、マウス癌細胞株における簡便な遺伝子ノックアウト細胞作製法)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

CRISPR-Cas9システムは2012年に発表されて以来、あらゆる動物細胞においてゲノム編集を行うことのできるツールとして広く普及し、生命科学研究においてなくてはならない存在となった。CRISPR-Cas9システムは、標的とする二本鎖DNAを切断してゲノム上にある任意の配列を削除、又は任意の配列を挿入することにより任意の遺伝子をノックアウト/ノックインすることのできるシステムである。しかしながら、削除する標的配列が短い場合においては、宿主側がエキソンスキッピングやスプライシングバリアントを生成することによって、目的のタンパク質をつくりだしてしまうことがある。特にがん細胞においては、がん細胞特異的なスプライシングバリアントの生成が複数報告されており、ゲノム編集を行う上では注意が必要である。更に、がん細胞は染色体不均一性という性質によりほとんどが多倍体や異数性などを示すことが知られており、標的配列を効率よく削除する方法が求められている。本研究では、このようながん細胞において効率良くノックアウト細胞を得ることを目的として、CRISPR-Cas9システムを用いた新たなゲノム編集法の開発するために検討を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

本研究では、がん細胞で効率よくゲノム編集を行う手段としてSUCCESS(Single-strand oligodeoxynucleotides, Universal Cassette, and CRISPR/Cas9 produce Easy Simple knock-out System)法を開発した。SUCCESS法では、標的遺伝子のほぼ全長を薬剤耐性遺伝子カセットに置換することにより、予期しないタンパク質発現を防ぐ。薬剤耐性遺伝子カセットを挿入することによってノックアウトを行う場合、一般的なノックインと同様にターゲティングベクターを作製する必要があるが、少々煩雑で時間のかかる作業を有する。SUCCESS法では、ターゲティングベクターを鎖状かつ平滑末端処理をした全遺伝子共通のユニバーサルカセット及び、カセットと標的配列ののりしろとなる80bpの一本鎖DNAで代用することにより、ノックアウト細胞を得るまでの時間を大幅に短縮した。SUCCESS法の条件検討を行う細胞として、B16F10マウスメラノーマ細胞株、標的遺伝子としてApoDを用いた。5'及び3'末端近傍にそれぞれgRNAを設計し、ApoDのほぼ全長となる約17700bp程度が薬剤耐性カセットに置き換わるようにCRISPRの設計を行った。その後、エレクトロポレーションにより2つのgRNA-Cas9複合体発現ベクター、ユニバーサルカセット、2本ののりしろ一本鎖DNAを細胞に導入した。エレクトロポレーション後の細胞を通常よりも20-30倍程度高濃度の薬剤でセレクションすることにより、93クローン中、8クローンでノックアウト体を得た。また、同様の方法によりID8マウス卵巣がん細胞においてAntxr2遺伝子をノックアウトした。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究では、多倍体、異数性の性質をもつがん細胞において効率よくゲノム編集を行う方法として、SUCCESS法を開発した。複数の薬剤耐性遺伝子カセットを用意することにより、一度の検討でノックアウトクローンが得られなかった場合においても、ヘテロ接合体への再エレクトロポレーションを行うことによって高確率でノックアウト体を得ることが出来る。また、同じ細胞に対してダブルノックアウト、トリプルノックアウトを作製するような応用例においても、複数の薬剤耐性遺伝子カセットを準備することで対応可能である。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）石橋　亜衣里

		(職)	氏　　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	河原行郎	署名
	副　査	大阪大学教授	竹田　潔	署名
	副　査	大阪大学教授	森井英一	署名

論文審査の結果の要旨

本論文は、通常細胞とは異なる性質をもつがん細胞において効率的に標的遺伝子をノックアウトする手法を示した論文である。がん細胞は染色体不均一性を示すことや、がん細胞特異的なスプライシングバリアントを生成することが原因で、通常細胞と比較してノックアウト細胞を得ることが困難である。本論文では、がん細胞で効率よくゲノム編集を行う手段としてSUCCESS法を開発した。SUCCESS法は、CRISPR-Cas9システムを基本として、鎖状かつ平滑末端処理をした薬剤耐性カセット及び80bpの一本鎖DNAを用いて遺伝子導入を行う。また、導入後の細胞を高濃度の薬剤でセレクションを行うことで、ノックアウト細胞を得るまでの時間を大幅に短縮した。既にSUCCESS法により多くのノックアウト細胞が樹立されており、本論文は今後の研究を円滑に進める為の重要な方法論を示した論文といえる。従って、本論文は学位論文に値する。