

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究																																																																																									
研究課題		NOG マウスをプラットフォームとした消化器がん発生・悪性化研究のための新規モデルマウスの開発																																																																																									
研究代表者	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所動物資源基盤技術センター長・高橋利一																																																																																									
研究分担者	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所動物資源基盤技術センター資源開発室・研究員・伊田幸																																																																																									
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター資源開発室・研究員・香川貴洋																																																																																									
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター資源開発室長 後藤元人																																																																																									
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸																																																																																									
【研究目的】	発がんの特に初期過程において、免疫反応が発がんによどのように作用するのかは、spontaneous cancer model を用いた解析はあまりなされていない。金沢大学がん進展制御研究所・大島正伸教授が開発された APCΔ716 ノックアウトマウスに対して、実中研で開発した NOG マウスの重度免疫不全形質の導入により、APC 遺伝子変異による Wnt 活性化による大腸がん発生過程において宿主免疫反応の役割を解明できる。本研究ではゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas システムを利用して、APC 遺伝子に変異を持った NOG マウス (APC-NOG) を作製することを目的とした。																																																																																										
【研究内容・成果】	1) 標的配列の設計 MIT の Feng Zhang の研究室のホームページで公開されている、CRISPR Design Tool を使って、APC 遺伝子の 716 番目のコドン近傍に、4 種類の標的配列を設計することができた。 2) GFP アッセイの結果 pX330 プラスミドおよび pCAG-EGFP プラスミドを用い、HEK293 細胞を使った GFP アッセイにて標的配列の切断活性を評価し、3 つの標的配列を選抜した。 3) DNA インジェクションの結果 NODxNOG マウス受精卵に対し、既報に基づき DNA 量を 5ng/ul で 1st トライを行ったが産子取得から低迷し、離乳産子 2 匹を得るのみであった。APCΔ716 ノックアウトマウスはホモ致死であることから、DNA 量を 1.5ng/ul に変更し 2nd トライを行った結果、26 匹の産子を得る事ができた。 4) 変異個体の選抜 28 匹 (2 匹 (1st) +26 匹 (2nd)) で得られたファウンダーマウスのテールからゲノム DNA を抽出、PCR し、PCR 産物をダイレクトシーケンスした。ダイレクトシーケンスでは判断できなかった個体については、PCR 産物を TA クローニングすることによって分離してからシーケンスした。その結果 19 匹 (0 匹 (1st) +19 匹 (2nd)) の変異個体が得られ、そのうち、6 種のフレームシフトの起こる個体 (モザイクも含む) が 10 匹得る事が出来た。(下表) <table><caption>APCΔ変異 ファウンダーマウスリスト</caption><thead><tr><th>個体番号</th><th>誕生日</th><th>性別</th><th>APC</th><th>APC変異</th><th>APCΔ</th><th>IL-2Rβ</th><th>scid</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>6</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>7</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-13, -6, -5, -1</td><td>Δ719, Δ733, Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>8</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>10</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-15+5, -35</td><td>Δ717, Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>16</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>+/-Y</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>18</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>+/-Y</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>23</td><td>2014/10/1</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-2, -2+6</td><td>Δ734, Δ736</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>24</td><td>2014/10/1</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-5</td><td>Δ733</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>28</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-2</td><td>Δ734</td><td>+/-Y</td><td>scid/+</td></tr></tbody></table> 5) 今後の展望 NOG マウスとの交配により F1 マウスを作出し、APCΔ716 と同様に腸管腫瘍が発生するか検証する。またオフターゲット切断の有無の検査を実施する。また、今後本系統の頒布に向けシーケンシングに寄らない PCR genotyping 検査系を確立する。APCΔ-NOG マウスの系統樹立及び論文化を目指す。			個体番号	誕生日	性別	APC	APC変異	APCΔ	IL-2Rβ	scid	4	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	6	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	7	2014/9/24	♀	MT/WT	-13, -6, -5, -1	Δ719, Δ733, Δ723	KO/+	scid/+	8	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	10	2014/9/24	♀	MT/WT	-15+5, -35	Δ717, Δ723	KO/+	scid/+	16	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/-Y	scid/+	18	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/-Y	scid/+	23	2014/10/1	♀	MT/WT	-2, -2+6	Δ734, Δ736	KO/+	scid/+	24	2014/10/1	♀	MT/WT	-5	Δ733	KO/+	scid/+	28	2014/10/1	♂	MT/WT	-2	Δ734	+/-Y	scid/+
個体番号	誕生日	性別	APC	APC変異	APCΔ	IL-2Rβ	scid																																																																																				
4	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																				
6	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																				
7	2014/9/24	♀	MT/WT	-13, -6, -5, -1	Δ719, Δ733, Δ723	KO/+	scid/+																																																																																				
8	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																				
10	2014/9/24	♀	MT/WT	-15+5, -35	Δ717, Δ723	KO/+	scid/+																																																																																				
16	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/-Y	scid/+																																																																																				
18	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/-Y	scid/+																																																																																				
23	2014/10/1	♀	MT/WT	-2, -2+6	Δ734, Δ736	KO/+	scid/+																																																																																				
24	2014/10/1	♀	MT/WT	-5	Δ733	KO/+	scid/+																																																																																				
28	2014/10/1	♂	MT/WT	-2	Δ734	+/-Y	scid/+																																																																																				
【成果等】	【主な論文発表】 なし																																																																																										
	【学会発表】 なし																																																																																										
	【その他特筆事項】 なし																																																																																										