サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目的で施行された。 乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いたMole-genome Mcorkout screenを行った。具体的には、Cas9を安定発現したMCF7に対してレンチウイルスを媒介としてWhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCF7にWhole-genome libraryを感染させ、hygromycinで感染細胞を選択した後に、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞からgenomic DNAを抽出した。それぞれのsgRNAに付随するバーコードをPCRにて増幅させ、NGSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現量の解析を施行中であり、との遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析に不耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現量の解析を施行中であり、との遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析に不耐性遺伝子の候析が遺伝出来た際には、それらの機構遺伝子に対応するsgRNAのカスタムライブラリーを作成し、secondary screenを行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vitroおよびin vivoで実際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで表際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のがクメム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vitroおよびin vitroおよびin vitroをはではではではではではではではではではいまないないまで表によるでは同じないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまな	Reio 7.550ciatea Reposi	To Academic resources
Ruthor 外山、要子(Nagayama, Aiko) Publisher 慶應義塾大学 Publication year 2022  Jittle 学事振興資金研究成果実績報告書 (2021.)  Abstract 本研究は、転移・再発性ホルモン受容体陽性・HER2陰性乳癌の治療において中心的役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目ので施行された。乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR(Cas9ゲノム編集を用いたwhole-genome knockout screenを行った。具体的には、Cas9を安定発現したMCF7に対してレンチウイルスを媒介としてwhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿とされ、対応する遺伝子がRnockoutされるようにpooled screenを行った。QAをMOF7にWhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿とされ、対応する遺伝子がRnockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCF7にWhole-genome libraryを感染させ、Nygromycinで感染細胞を選択した後に、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞からgenomic DNAを抽出した。それぞれのsgRNAに行随するパーコードをPCRにて増幅させ、NGSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の根補を解析した。細胞周期に関わるRb遺伝子なと、すてに無すで認定された耐性遺伝子の根本経記とた。現在学科を課と、大日の候補遺伝子なた。すてに無すで認定された耐性遺伝子の候補が遺産出来に際には、それら候補遺伝子なかったかを解析中であり、どの遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析である。この解析にて耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性査後で表をRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性を復得するか確認を行う。 This study was conducted to elucidate the mechanisms of resistance acquisition to cyclindependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors, which play a central role in the treatment of patients with metastatic or recurrent hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. A whole-genome knockout screen using CRISPR/Cas9 genome editing was performed on MCF7, a breast cancer cell line. Specifically, the whole-genome library was infected via lentivirus into MCF7 cells which vertex and selection of infected cells with hygromycin, palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, was added and the cells were cultured for about 2 weeks. Genomic DNA was extracted from the end product cells that survived after culture. Barcodes associated with each sgRNA were amplified by PCR and analyzed by NGS sequencing to identify candidate resistance genes. The expression of resistance genes	Title	乳癌におけるCRISPRゲノム編集によるCDK4/6阻害剤の網羅的耐性機序の解明
Publisher	Sub Title	·
Publication year	Author	永山, 愛子(Nagayama, Aiko)
Jalc DOI  Abstract  本研究は、転移・再発性ホルモン受容体陽性・HER2陰性乳癌の治療において中心的役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目的で施行された。乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いたwhole-genome knockout screnを行った。具体的には、Cas9を支定発現したMCFFでに対してレンチウイルスを媒介としてwhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCFTでにwhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCFTでにwhole-genome libraryを感染させ、1分に表生では、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞からgenomic DNAを抽出した。それぞれのsgRNAに付随するパーコートをPCRにて増幅させ、NCSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の残積を解析した。細胞周期に関わるRD遺伝子など、すでに既線で確認された耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現・現金の解析を施行中であり、どの遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投ラFnの細胞増殖につながったかを解析中である。この解析にて耐性遺伝子の候補が遺定出来で際には、それらの候補遺伝子に対応するsgRNAのカスタムライブラリーを作成し、secondary screenを行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でフィックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性を獲得するか確認を行う。 This study was conducted to elucidate the mechanisms of resistance acquisition to cyclindependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors, which play a central role in the treatment of patients with metastatic or recurrent hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. A whole-genome knockout screen using CRISPR/Cas9 genome editing was performed on MCF7、a breast cancer cell line. Specifically, the whole-genome library was infected via lentivirus into MCF7 cells which stably express Cas9, so that one single guide RNA (sgRNA) would be inserted per cell, and the corresponding gene would be knocked out. After infection of Cas9-MCF7 with the whole-genome library and selection of infected cells with hygromycin, palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, was added and the cells were cultured for about 2 weeks. Genomic DNA was extracted from the end product cells that survived after culture. Barcodes associated with each sgRNA were amplified by PCR and analyzed by NGS sequencing to identify candidate resistance genes involved in the cell cycle, was confirmed. Detailed analysis of sgRNA expression levels is currently underway to determi	Publisher	慶應義塾大学
Abstract Abstract AFRICA TOO Abstract AFRICA TOO ABSTRACT ABSTRA	Publication year	2022
本研究は、転移・再発性ホルモン受容体陽性・HER2陰性乳癌の治療において中心的役割を果たすサイクリン体存性キナーゼ(CDK)4(B阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目的で施行された。乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR/Cas9ゲンム編集を用いた動わらegenome knockout screenを行った。具体的には、Cas9を安定発現したMCF7に対してレンチウイルスを媒介としてwhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCF7にwhole-genome libraryを感染させ、hygromycinで感染細胞を選択した後に、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞がらgenomic DNAを抽出した。それぞれのgRNALの行随するパーコードをPCRにて増幅させ、NGSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の発規を解形した。細胞周期に関わるRb遺伝子など、すでに既報で確認された耐性遺伝子の発規を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現・最前がたがったがを解析中である。この解析に方能性遺伝子の模様が選定出来た際には、それらの候権遺伝子とに対応する家RNAのカスタムライブラリーを作成し、secondary screenを行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性を獲得するか確認を行う。This study was conducted to elucidate the mechanisms of resistance acquisition to cyclindependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors, which play a central role in the treatment of patients with metastatic or recurrent hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. A whole-genome knockout screen using CRISPR/Cas9 genome editing was performed om CF7, a breast cancer cell line. Specifically, the whole-genome library was infected via lentivirus into MCF7 cells which stably express Cas9, so that one single guide RNA (sgRNA) would be inserted per cell, and the corresponding gene would be knocked out. After infection of Cas9-MCF7 with the whole-genome library and selection of infected cells with hygromycin, palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, was added and the cells were cultured for about 2 weeks. Genomic DNA was extracted from the end product cells that survived after culture. Barcodes associated with each sgRNA were amplified by PCR and and analyzed by NGS sequencing to identify candidate resistance genes. The expression of resistance genes already confirmed in previous reports, such as the Rb gene involved in the cell cycle, was confirmed. Detailed analysis of sgRNA sycression levels is currently underway to determine which genes were knocked out, leading to cell proliferation under palbocicl	Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021.)
サイクリン依存性キナーゼ(CDK)4/6阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目的で施行された。 乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いたMole-genome Mcorkout screenを行った。具体的には、Cas9を安定発現したMCF7に対してレンチウイルスを媒介としてWhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCF7にWhole-genome libraryを感染させ、hygromycinで感染細胞を選択した後に、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞からgenomic DNAを抽出した。それぞれのsgRNAに付随するバーコードをPCRにて増幅させ、NGSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現量の解析を施行中であり、との遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析に不耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現量の解析を施行中であり、との遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析に不耐性遺伝子の候析が遺伝出来た際には、それらの機構遺伝子に対応するsgRNAのカスタムライブラリーを作成し、secondary screenを行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vitroおよびin vivoで実際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで表際に耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のがクメム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vitroおよびin vitroおよびin vitroをはではではではではではではではではではいまないないまで表によるでは同じないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまないまな	JaLC DOI	
Notes Genre Research Paper	Abstract	乳癌細胞株であるMCF7を対象に、CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いたwhole-genome knockout screenを行った。具体的には、Cas9を安定発現したMCF7に対してレンチウイルスを媒介としてwhole-genome libraryを感染させ、1細胞あたり1つのsingle guide RNA(sgRNA)が挿入され、対応する遺伝子がknockoutされるようにpooled screenを行った。Cas9-MCF7にwhole-genome libraryを感染させ、hygromycinで感染細胞を選択した後に、CDK4/6阻害剤であるpalbociclibを添加し、約2週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞からgenomic DNAを抽出した。それぞれのsgRNAに付随するパーコードをPCRにて増幅させ、NGSシーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の候補を解析した。細胞周期に関わるRb遺伝子など、すでに既報で確認された耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細なsgRNAの発現量の解析を施行中であり、どの遺伝子がknockoutされることでpalbociclib投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析にて耐性遺伝子の候補が選定出来た際には、それらの候補遺伝子に対応するsgRNAのカスタムライブラリーを作成し、secondary screenを行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子をCRISPR/Cas9のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitroおよびin vivoで実際に耐性を獲得するか確認を行う。 This study was conducted to elucidate the mechanisms of resistance acquisition to cyclindependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors, which play a central role in the treatment of patients with metastatic or recurrent hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. A whole-genome knockout screen using CRISPR/Cas9 genome editing was performed on MCF7、a breast cancer cell line. Specifically, the whole-genome library was infected via lentivirus into MCF7 cells which stably express Cas9, so that one single guide RNA(sgRNA) would be inserted per cell, and the corresponding gene would be knocked out. After infection of Cas9-MCF7 with the whole-genome library and selection of infected cells with hygromycin, palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, was added and the cells were culture for about 2 weeks. Genomic DNA was extracted from the end product cells that survived after culture. Barcodes associated with each sgRNA were amplified by PCR and analyzed by NGS sequencing to identify candidate resistance genes. The expression of resistance genes already confirmed in previous reports, such as the Rb gene involved in the cell cycle, was confirmed. Detailed analysis of sgRNA expression levels is currently underway to determine which genes were knocked out, leading to cell proliferation under palbociclib treatment. When candidate genes will be kno
	Notes	
URL https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210248	Genre	Research Paper
	URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210248

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって 保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# 2021 年度 学事振興資金 (個人研究) 研究成果実績報告書

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教(有期・医学部)	一 補助額	300 (	` <b>^</b> \ =	千円
	氏名	永山 愛子	氏名 (英語)	Aiko Nagayama		300 (A)	, <b>A</b> ) ¬	,,,

#### 研究課題 (日本語)

乳癌における CRISPR ゲノム編集による CDK4/6 阻害剤の網羅的耐性機序の解明

#### 研究課題 (英訳)

The identification of mechanisms of CDK4/6 inhibitor resistance in breast cancer by CRISPR/Cas9 knockout screen

## 1. 研究成果実績の概要

本研究は、転移・再発性ホルモン受容体陽性・HER2 陰性乳癌の治療において中心的役割を果たすサイクリン依存性キナーゼ (CDK)4/6 阻害剤の耐性獲得メカニズムを解明する目的で施行された。乳癌細胞株である MCF7 を対象に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いた whole-genome knockout screen を行った。具体的には、Cas9 を安定発現した MCF7 に対してレンチウイルスを媒介として whole-genome library を感染させ、1細胞あたり 1 つの single guide RNA (sgRNA) が挿入され、対応する遺伝子が knockout されるように pooled screen を行った。Cas9-MCF7 に whole-genome library を感染させ、hygromycin で感染細胞を選択した後に、CDK4/6 阻害剤である palbociclib を添加し、約 2 週間の培養を行った。培養後に生存した最終産物の細胞から genomic DNA を抽出した。それぞれの sgRNA に付随するバーコードを PCR にて増幅させ、NGS シーケンサーで解析を行い、耐性遺伝子の候補を解析した。細胞周期に関わる Rb 遺伝子など、すでに既報で確認された耐性遺伝子の発現を確認した。現在、詳細な sgRNA の発現量の解析を施行中であり、どの遺伝子が knockout されることで palbociclib 投与下の細胞増殖につながったかを解析中である。この解析にて耐性遺伝子の候補が選定出来た際には、それらの候補遺伝子に対応する sgRNA のカスタムライブラリーを作成し、secondary screen を行うことが可能となる。そのように同定された耐性遺伝子を CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術でノックアウトし、in vitro および in vivo で実際に耐性を獲得するか確認を行う。

### 2. 研究成果実績の概要(英訳)

This study was conducted to elucidate the mechanisms of resistance acquisition to cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors, which play a central role in the treatment of patients with metastatic or recurrent hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. A whole-genome knockout screen using CRISPR/Cas9 genome editing was performed on MCF7, a breast cancer cell line. Specifically, the whole-genome library was infected via lentivirus into MCF7 cells which stably express Cas9, so that one single guide RNA (sgRNA) would be inserted per cell, and the corresponding gene would be knocked out. After infection of Cas9-MCF7 with the whole-genome library and selection of infected cells with hygromycin, palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, was added and the cells were cultured for about 2 weeks. Genomic DNA was extracted from the end product cells that survived after culture. Barcodes associated with each sgRNA were amplified by PCR and analyzed by NGS sequencing to identify candidate resistance genes. The expression of resistance genes already confirmed in previous reports, such as the Rb gene involved in the cell cycle, was confirmed. Detailed analysis of sgRNA expression levels is currently underway to determine which genes were knocked out, leading to cell proliferation under palbociclib treatment. When candidate genes for resistance are selected through this analysis, a custom library of sgRNAs corresponding to these candidate genes will be created and a secondary screen can be performed. The identified resistance genes will be knocked out using CRISPR/Cas9 genome editing technology, and whether they actually acquire resistance in vitro and in vivo will be confirmed.

3. 本研究課題に関する発表								
発表者氏名 (著者・講演者	<b>新</b> ) (著	発表課題名 著名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)				