

■受領No.1405 (中間報告)

CRISPR/Cas9 技術を応用した皮膚癌における 新規エピゲノム編集の開発

代表研究者

應田 涼太

北海道大学大学院医学研究院 助教

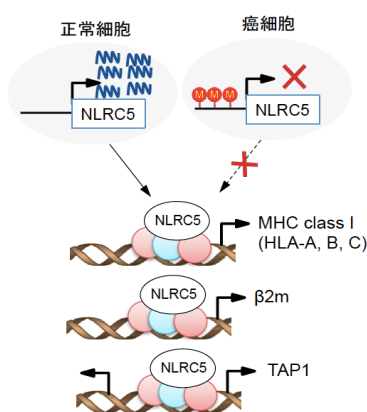


1. 研究目的

免疫チェックポイント阻害剤の登場は、癌治療に大きなインパクトを与えて来ている。

従来の治療法では全く無効であった進行癌にも、著明な治療効果を示す例も多々報告されている。しかしながら、未だ、こうした癌免疫療法に反応する癌患者は少数派であり、多くの癌患者では治療効果が認められない。

多くの原因が考えられるが、一つは現在の癌免疫療法が、免疫系をいかに賦活化させるかに重きを置いており、その相手方である癌がいかに免疫系から逃れているかに対応出来ていないことが原因である。これまで我々の研究グループは、21種類の固形癌約8000検体、正常組織約3000検体のデータを解析した結果、MHC class I 遺伝子群のマスター転写補因子である NLRC5 の発現および機能低下が癌の免疫逃避システムにおいて重要な役割を担っていることを



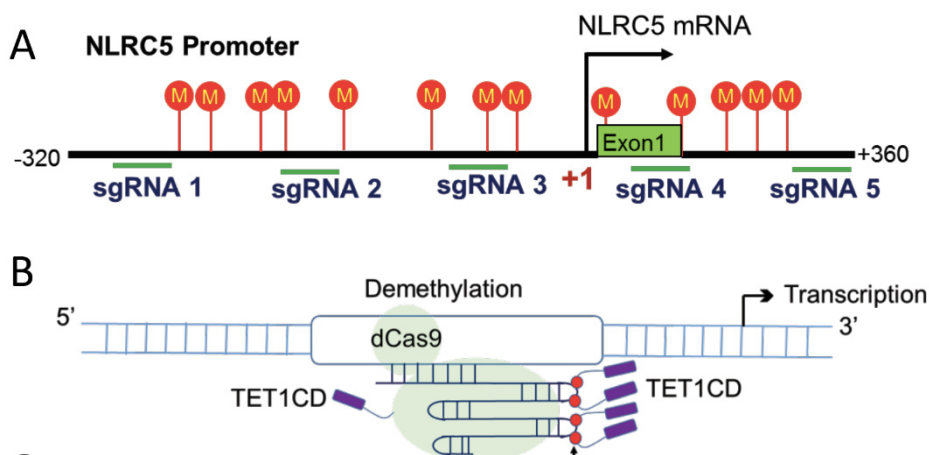
(図1) NLRC5 を標的とした
癌免疫逃避機構

癌細胞では NLRC5 プロモーター領域のメチル化が高頻度で見られ、その結果MHC-I 遺伝子発現も抑制されている。

見出した (Proc Natl Acad Sci USA.107(31):13794-9.)。さらに、癌組織においては NLRC5 遺伝子プロモーターのメチル化が高頻度に起きており、MHC class I 抗原提示経路が機能不全となることにより、癌が免疫機構から逃避することが示された(図1)。実際、NLRC5 の発現レベルやメチル化度は各種癌において5年生存率に大きく関わっていることが我々の研究によって明らかとなった。以上のことから、NLRC5 遺伝子脱メチル化による癌免疫逃避の阻害が新たな癌治療戦略において有用であると考えに至った。しかし、既存の脱メチル化剤は非特異的であるため強い副作用を有し、一部の癌にしか用いることができない。そのため、特異的な DNA 脱メチル化技術の開発が長く望まれていた。本研究は、CRISPR/Cas9 システムを応用した新しい特異的脱メチル化技術の開発を行うことにより、新規癌治療戦略の可能性を明らかにすることが目的である。本研究によって、癌細胞における効果的な遺伝子発現制御技術が開発されることが期待される。

2. 研究内容

これまで我々の研究から、悪性黒色腫患者の5年生存率と NLRC5 遺伝子発現量が相関し、NLRC5 遺伝子のメチル化度と逆相関することが明らかとなった。そこで NLRC5 を標的遺伝子として、マウス悪性黒色腫細胞株(B16F10)にて CRISPR/Cas9 システムを応用した遺伝子特異的脱メチル化技術開発を行った。



(図2) CRISPR/Cas9を応用したNLRC5脱メチル化技術

(A) NLRC5メチル化部位に結合するように設計したガイドRNA(sgRNA)。

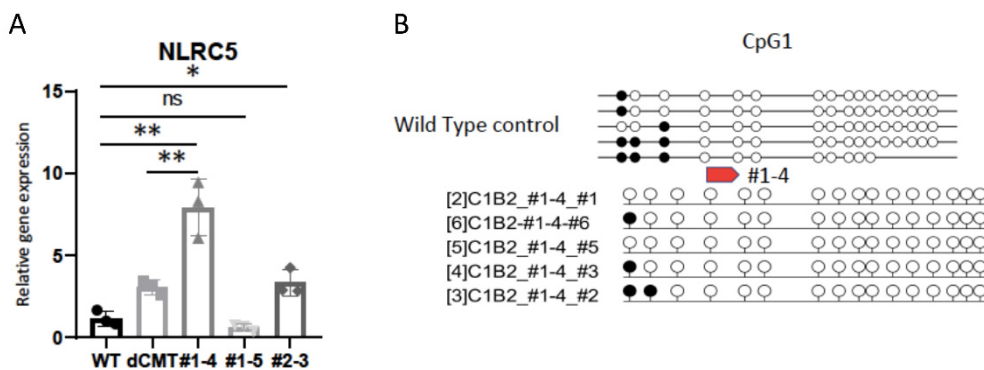
(B)dCas9と脱メチル化酵素(TET1CD)がガイドRNAによってメチル化部位に結合する模式図。

2.1 NLRC5遺伝子を標的とする脱メチル化システムの構築

我々はCRISPR/Cas9技術を改変することにより、遺伝子選択的に脱メチル化酵素を標的部位へ送り込むことを目指した。具体的には、①酵素活性を欠損させたCas9(dCas9)と脱メチル化酵素TET1を融合させた発現ベクター(dCas9-TET1) ②遺伝子特異的なガイドRNA発現ベクター(sgRNA) ③sgRNA特異的に結合するバクテリオファージ由来MS2 coat proteinと脱メチル化酵素TET1を融合させた発現ベクター(MS2-TET1)を作製した(図2)。

2.2 In vitroにおけるNLRC5遺伝子脱メチル化の確認

上記の脱メチル化誘導発現ベクターを用いてNLRC5の発現量をqPCRによって測定し、脱メチル化割合はバイサルファイトシーケンス法によって検討を行った。複数の発現ベクターを細胞内に導入するのは非効率であると考えられることから、dCas9-TET1とMS2-TET1をStableに発現する細胞をレンチウイルスによって作成した。そこへNLRC5遺伝子を標的とするgRNAをレンチウイルスによって導入し、NLRC5遺伝子脱メチル化を試



(図3) NLRC5遺伝子標的としたgRNAによるNLRC5発現量と脱メチル化の確認

dCas9 stable B16F10細胞に設計したNLRC5標的gRNAを導入し(A) qPCRによってNLRC5の発現量 (B) バイサルファイトシーケンス法によって脱メチル化を測定した。●: メチル化部位

みた。その結果、gRNA (#1-4)を導入することによってNLRC5発現量の上昇が見られ、NLRC5遺伝子プロモーター上に存在するメチル化領域(CpG1)において、脱メチル化が確認された(図3)。

2.3 NLRC5 遺伝子脱メチル化技術の改良

上記のように脱メチル化酵素(TET1)をgRNAによってNLRC5遺伝子上へ送り込み、発現量の上昇と脱メチル化が観察された。しかし、NLRC5遺伝子発現量の増加が見られたにも関わらず、MHC-I遺伝子の発現量に差が観られなかったことからNLRC5発現誘導が不十分であると考えられる。そこで、dCas9技術を改変し、更なるNLRC5発現誘導を目指した。具体的には、脱メチル化酵素(TET1)にNLRC5の転写因子であるp65を付け加えた融合タンパク質(TET1-p65)を作成し(図4A)、NLRC5遺伝子を標的としたgRNAによってTET1-p65をNLRC5プロモーター領域に送り込んだ。その結果、脱メチル化酵素(TET1)単独を送り込んだ場合より、転写因子融合脱メチル化酵素(TET1-p65)を送り込むことによってNLRC5発現量の更なる増加が見られ、またMHC-I関連遺伝子であるLMP2の発現量の上昇も得られた(図4B)。

2.4 今後の予定

(i) マウス悪性黒色腫モデルにおけるin vivoでのエピジェネティック編集技術の開発

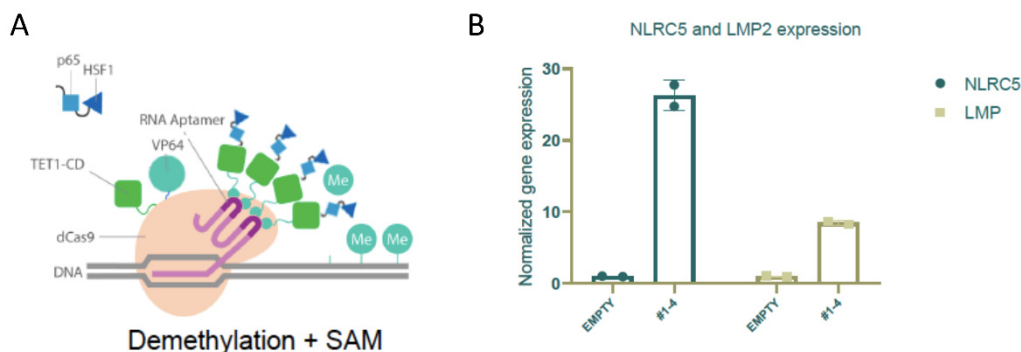
マウスにおける癌モデルを用い、エピゲノム編集を癌における遺伝子発現をコントロールする技術として応用し、将来的に新しい癌治療戦略としての有用性を明らかにする。マウス悪性黒色腫細胞株を同系のC57BL/6マウスに移植し、エピゲノム編集レンチウイルスを隔日ごとに腫瘍内に経皮投与し、腫瘍内CD8+T細胞数、活性度、腫瘍サイズ、生存曲線を求める。高い治療効果が得られない場合には、NLRC5同様に発現がDNAメチル化により抑制されている癌抑制遺伝子や免疫系遺伝子をエピジェネティック編集標的として付け加える。

(ii) NLRC5 DNA 脱メチル化による免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の評価

現在、免疫チェックポイント阻害剤は一部の患者にのみ著効を示す。免疫チェックポイント阻害剤の治療効果はCD8+T細胞の活性化に依存することから、我々の予備実験データから推測するに不応症例のかなりの割合がNLRC5の発現または機能不全によるものである可能性がある。そこで、上記の悪性黒色腫モデルマウスをエピゲノム編集によってNLRC5の脱メチル化を行うと同時に免疫チェックポイント阻害剤で治療し、治療効果を腫瘍内CD8+T細胞数、活性度、腫瘍サイズ、生存率によって評価する。

3. 発表(研究成果の発表)

本研究終了後、国際雑誌に投稿予定である。



(図4) 転写因子融合脱メチル化酵素の作成とNLRC5誘導の確認

(A) 転写因子p65を融合させた脱メチル化酵素がgRNAによって標的遺伝子に集積される模式図。

(B) NLRC5遺伝子を標的としたgRNA導入し、NLRC5, LMP2発現量をqPCRで測定した。