

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07225

研究課題名(和文)新規免疫チェックポイント分子DC-HILを標的としたがん治療の研究

研究課題名(英文)Osteoactivin/GP-nmb/DC-HIL-CD44 as immune checkpoint targets for cancer therapy

研究代表者

堀内 大(Horiuchi, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30608906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Osteoactivin/GP-nmb/DC-HILはSyndecan-4やCD44などとの結合を介してがんの病態進展に影響を及ぼす。

本研究は、特にCD44に着目し、CRISPR-Cas9システムによりCD44遺伝子をノックアウトできるガイドRNA配列を複数決定し、それを用いてノックアウト腫瘍細胞株を樹立できた。

さらに、上記のCRISPR-Cas9システムを生体腫瘍内に運搬し、生体内で腫瘍細胞のゲノム編集を行うことを目指し、CRISPR-Cas9プラスミドを組み込んだ細菌を作成して腫瘍細胞への感染させたところ、感染腫瘍細胞にCRISPR-Cas9プラスミド由来のGFPが発現することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9によるゲノム編集システムにより、がん病態の進展に関わる遺伝子を破壊することが可能なガイドRNA配列を決定した。このゲノム編集システムを生体内のがん組織内で機能させることができれば、がんの治療法選択肢が増えることにつながる。

上述のゲノム編集システムを生体腫瘍組織内で機能させる方策として、ベクターシステムとして検討した細菌は、腫瘍細胞で外来遺伝子を発現し、さらに腫瘍細胞に特徴的な細胞変性効果を引き起こした。このことは、本細菌を利用したがんのBacterial therapyの可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Osteoactivin/GP-nmb/DC-HIL affects the progression of cancer through binding to Syndecan-4 and CD44.

In this study, we determined guide RNA (gRNA) sequences that can knock out CD44 gene using the CRISPR-Cas9 system, and established knockout tumor cell lines. In addition, the CRISPR/Cas9-system targeting CD44 was electroporated in bacteria to utilize in vivo genome editing. The modified bacteria was infected into B16F10 cells. The bacteria-possessing B16F10 cells expressed GFP derive from the CRISPR/Cas9-system.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の過程にある微小環境では、集簇したマクロファージが発現する Osteoactivin/GP-NMB/DC-HIL が CD44 との結合を介して間葉系幹細胞の増殖を促進することが報告されている。この双方の分子は様々な腫瘍細胞の膜上に発現しており、創傷治癒の過程で観察される細胞増殖促進的微小環境形成は、がん微小環境においても成立している可能性が考えられる。

上述のように、CD44 をはじめとするこれらの分子は、腫瘍細胞のみならず正常細胞にも発現している。このことから、腫瘍組織をターゲティングできる効率の良いベクターシステムの開発によって、前述の分子由来シグナルを標的とした新たながん治療方策の道筋を立てることができると思われる。

## 2. 研究の目的

上述の分子結合、特に CD44 を介したシグナルが腫瘍増殖に与える影響を確認し、腫瘍病態進展に対する役割を明らかにすることを目指して研究を推進した。また、当該シグナルを遮断可能な CRISPR/Cas9 システムを設計し、それを生体腫瘍組織内で機能させるために必要となる腫瘍集積性の良い微生物ベクターの可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) CRISPR/Cas9 システムによる CD44 ノックアウト細胞の樹立

CRISPR/Cas9 により当該分子発現をノックアウトするための候補ガイド RNA 配列は、Web ツール CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) を用いて 3 種類の配列を設計した。この配列のオリゴ DNA をユーロフィンジェノミクス社で人工合成し、ORIGENE 社 pCas-Guide-EF1a-GFP vector に組込んだ。作製した各 vector を、Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific 社)によりマウス線維芽細胞株 NIH3T3 に遺伝子導入した。遺伝子導入 4 日後に細胞を回収し、各ガイド RNA ごとに CRISPR/Cas9 誘導性ミスマッチ変異誘導能を確認した。変異誘導能の確認は、細胞から DNA を抽出し、gRNA 標的部位を Nested PCR で増幅し、PCR 産物を T7 エンドヌクレアーゼで処理し、DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動で確認した。変異誘導能が確認できた vector を Lipofectamine LTX によりマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 に遺伝子導入し、遺伝子導入 4 日後にセルソーターで GFP 陽性細胞を分取した。分取した細胞を限界希釈法によりクローニングし、2 週間後増殖が見られたクローンを回収し、当該分子の発現をフローサイトメトリーにより確認した。当該分子の発現が確認できなかったクローンは DNA を抽出し、CRISPR/Cas9 誘導性ミスマッチ変異を持つことを上述の方法で確認した。

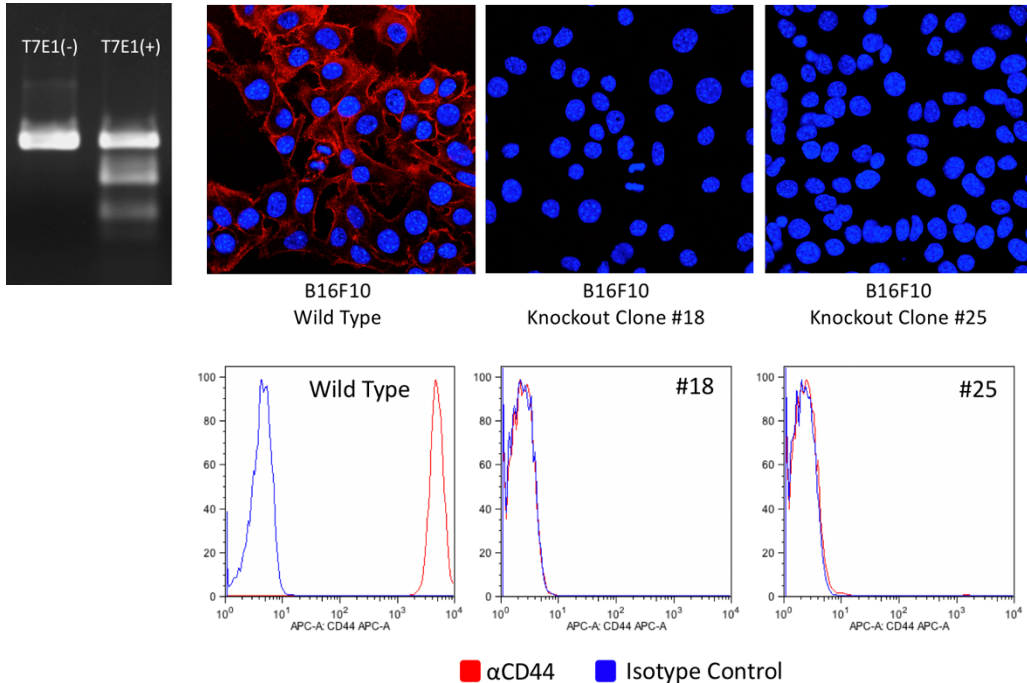
### 2) 微生物ベクターの検討

電気穿孔法により、1)の CRISPR/Cas9 プラスミドを遺伝子導入したネズミチフス菌株を作製した。作製菌株を B16F10 細胞に感染させ、感染細胞に CRISPR/Cas9 プラスミドが導入され、その機能が発現するかについてフローサイトメトリーにより確認した。

## 4. 研究成果

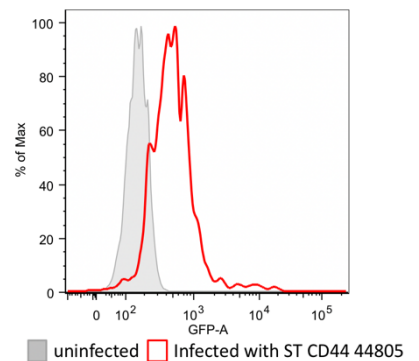
### (1) CD44 ノックアウト細胞の樹立

CD44 を介する当該シグナルが腫瘍細胞増殖に及ぼす影響を確認するための CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムの構築を行ない、効率よく CD44 をノックアウト可能なガイド RNA 配列を決定した（下図上段左：T7E1 アッセイによる変異導入確認）。このガイド RNA を組み込んだ CRISPR/Cas9 プラスミドをマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 に遺伝子導入し、遺伝子導入 4 日後に GFP 陽性細胞をセルソーティングし、限界希釈クローニングにより、CD44 ノックアウト B16F10 細胞クローンを複数樹立した（下図）。これらの CD44 ノックアウト B16F10 細胞の増殖性は、Wild Type と比較して明らかな差は認めなかった。



### (2) 微生物ベクターの検討

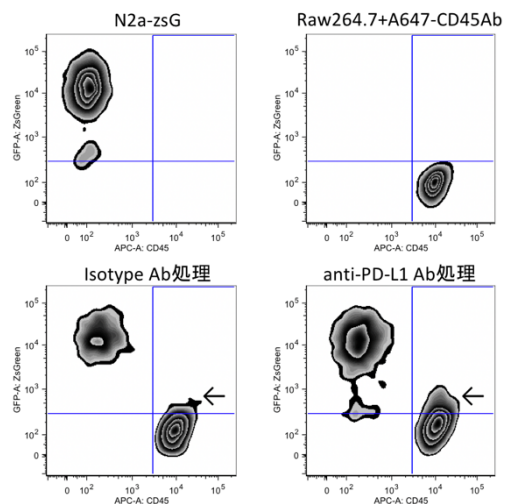
(1) の CRISPR/Cas9 プラスミドを生体腫瘍内に運搬し、腫瘍内でのみゲノム編集機能を発揮させることを目指し、上記のプラスミドを遺伝子導入したネズミチフス菌を作製した。この菌を B16F10 細胞に感染させ、感染細胞で導入プラスミドの機能が発現するかを検討した。感染細胞がプラスミドにコードされた遺伝子を発現するかをフローサイトメトリーで解析したところ、GFP 蛍光の発現を認めた（右図）。一方、CD44 の発現低下はごくわずかなものであった。また、本菌に感染した腫瘍細胞は特異な細胞変性を示し、多くは細胞死に陥った。この感染が引き起こす腫瘍細胞死は、それ自体腫瘍治療への応用が考えられる。



### (3) 腫瘍細胞被食性の検討

細胞死に陥った腫瘍細胞が免疫系に認識されるためには、まず抗原提示細胞に食食されることが必要である。この食食についての簡便な評価手段として、フローサイトメトリーを利用したアッセイ系を構築した。

食食のモデルとして、抗体依存性細胞食食の実験を行った。緑色蛍光タンパク質 zsGreen を発現させたマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞株 (N2a-zsG) を樹立し、この N2a-zsG の細胞表面に抗 PD-L1 抗体を結合させてから、マウスマクロファージ株 Raw264.7 細胞（食食細胞）と共培養を行った。オーバーナイトの共培養ののち、細胞を回収し、Raw264.7 細胞を AlexaFluor647 標識抗 CD45 抗体で染色した。腫瘍細胞を緑色 (ZsGreen)、食食細胞を赤色 (AlexaFluor647) で染め分け、赤色かつ緑色の細胞を食食細胞とした（右図矢印）。



この貪食細胞の割合は、アイソタイプコントロール抗体で処理した群と比較して、抗 PD-L1 抗体で処理した群で高かった。このことより、本方法は細胞貪食を正しく評価できると考えられた。そこで、この方法を利用して感染細胞の被貪食性について検討した。zsGreen を発現させた B16F10 (B16F10-zsG) を樹立して、その細胞にネズミチフス菌を感染させ、感染細胞と Raw264.7 細胞を共培養して細胞貪食を測定したところ、未感染細胞と比較して感染細胞では高い被貪食性を持つことが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seiichiro Inoue, Yutaka Horiuchi, Yumiko Setoyama, Yuta Takeuchi, Yoshifumi Beck, Takashi Murakami, Akio Odaka	4. 巻 253
2. 論文標題 Immune Checkpoint Inhibition Followed by Tumor Infiltration of Dendritic Cells in Murine Neuro-2a Neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Surg Res.	6. 最初と最後の頁 201-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2020.03.059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀内 大、岩田亮太郎、小林信春、村上 孝.
2. 発表標題 Salmonella感染は腫瘍細胞のImmunogenic cell deathを誘導するか.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 名古屋
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Horiuchi, Takashi Murakami.
2. 発表標題 Intra-tumoral infection of Salmonella typhimurium primes anti-tumor immune responses against murine B16 melanoma.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 広島
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 孝  (Murakami Takashi)  (00326852)	埼玉医科大学・医学部・教授    (32409)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高木 徹  (Takagi Akira)  (20536891)	埼玉医科大学・保健医療学部・助教    (32409)	
研究分担者	松井 政則  (Matsui Masanori)  (50199741)	埼玉医科大学・医学部・准教授    (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関