

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16681

研究課題名（和文）DNAメチル化をターゲットとした新しい乳癌治療の試み

研究課題名（英文）A new breast cancer treatment attempt targeting DNA methylation

研究代表者

應田 涼太（Ouda, Ryota）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：90817321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々の研究から、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。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。我々はNLRC5遺伝子メチル化が多くの癌において免疫逃避に関わっている事を見出した。新しい特異的脱メチル化技術の開発を行うことにより、癌免疫逃避に焦点を当てた新たな癌治療への応用に繋がる。

研究成果の概要（英文）：From our studies so far, our studies have revealed that the expression level and methylation level of NLRC5 are greatly related to the 5-year survival rate in various cancers. From the above, we have come to believe that inhibition of cancer immune escape by demethylation of the NLRC5 gene is useful in new cancer treatment strategies. However, existing demethylating agents have strong side effects because they are non-specific and can only be used for some cancers. Therefore, the development of a specific DNA demethylation technique has long been desired. The purpose of this study is to clarify the possibility of new cancer treatment strategies by developing a new specific demethylation technology that applies the CRISPR / Cas9 system.

研究分野：免疫学

キーワード：MHC class I NLRC5 DNA脱メチル化 CRISPR/Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌の中でもエストロゲン、プロジェストロン、EGF に対するレセプターを消失したものを、トリプルネガティブ乳癌と言い、他のタイプの乳癌より悪性度が高く、予後が悪いことで知られている。ホルモン療法などの標的治療法が使えず、新規治療法の開発が特に必要とされている。一方で、トリプルネガティブ乳癌は遺伝的にもエピゲノム的にも不安定であるため、癌新規抗原量が多く、また免疫原性も高いことが知られている (*Nature reviews. Clinical oncology* 13: 674-690.)。この事は新規治療のための分子学的標的が存在する可能性を示している。実際我々は、MHC class I 遺伝子群のマスター転写因子である NLRC5 の発現がトリプルネガティブ乳癌患者の生存に極めて重要であることを見出した (図 1)。また我々は、乳癌を含めた多くの癌種において NLRC5 の発現はプロモーターにおける DNA メチル化により抑制されており、主要な免疫逃避機構となっていることを明らかとした (図 2)。これらは NLRC5 が癌治療の有効なターゲットである事を示唆している。

2. 研究の目的

5-Azacytidine 等の非特異 DNA 脱メチル化剤は以前より存在するが、副作用が強く、一部の癌にしか用いることができない。遺伝子特異的な脱メチル化剤が開発できれば、NLRC5 を始めとする癌細胞にて抑制されている重要遺伝子を発現することが可能になり、トリプルネガティブ乳癌の新しい治療法として有望であると言える。本研究は NLRC5 を標的遺伝子として用い、新しい脱メチル化の技術開発をマウスの乳癌モデルを用いて行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌細胞株 (MCF7) における NLRC5 遺伝子のメチル化を CRISPR/Cas9 技術を用いて選択的に DNA 脱メチル化を行う。この実験により、*in vitro* における DNA 脱メチル化効率を最大限高めるべく条件検討を行う。

(2) マウス乳癌細胞株 (E0771) を同系の C57BL/6 マウスに移植し、(1)で効果が確認出来た CRISPR/Cas9 技術に基づく脱メチル化酵素を隔日ごとに腫瘍内に経皮投与し、腫瘍サイズ、生存曲線を求める。この実験により、*in vivo* における DNA 脱メチル化技術の確立を目指す。

(3) 免疫チェックポイント阻害剤の効果は MHC class I における抗原提示、それに続く CD8+T 細胞の活性化が必要である。よって、NLRC5 の発現が免疫チェックポイント阻害剤の効果に必須であることが考えられる。そこで、(2)で示した様に NLRC5 遺伝子の脱メチル化を行ったマウスに免疫チェックポイント阻害剤を投与し、その効果を腫瘍サイズ、生存率によって評価する。この実験により、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の拡大を目指す。

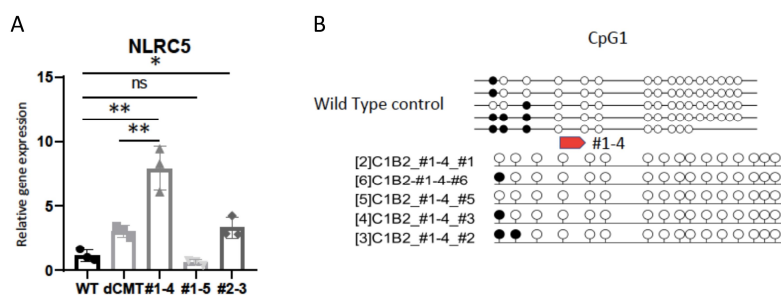
4. 研究成果

(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、酵素活性能を欠損させた 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) 遺伝子特異的なガイド RNA 発現ベクター (sgRNA) sgRNA 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。

(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



(図 1) 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

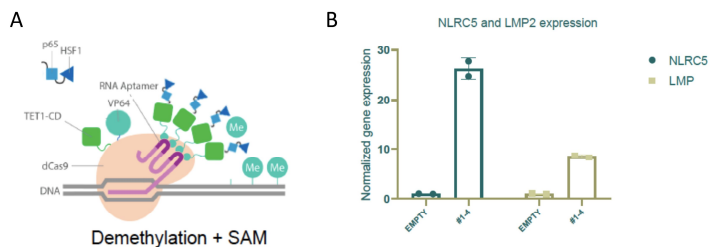
dCas9 stable B16F10 細胞に設計した NLRC5 標的 gRNA を導入し (A) qPCR によって NLRC5 の発現量 (B) バイサルファイトシーケンス法によって脱メチル化を測定した。●: メチル化部位

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。

(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 技術を改良し、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 2) 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。

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------