

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16818

研究課題名(和文) 免疫抑制能を規定する遺伝子発現制御機構の解明とがん免疫療法への応用

研究課題名(英文) Study of regulatory mechanisms of gene expression that determine immunosuppressive potential for application to cancer immunotherapy

研究代表者

平松 寛明(Hiramatsu, Hiroaki)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：70827253

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)：転写因子はゲノムDNAに結合し、遺伝子発現制御に寄与している。転写因子の解析手法であるクロマチン免疫沈降法は、特定の転写因子の解析に有用であるが、特定のゲノム領域を調べることができない。本研究では、dcas9を用いて部位特異的なゲノム領域を単離する方法を評価した。ウイルスベクター、あるいはリコンビナントdCas9を用いた方法を開発し、転写因子複合体の免疫沈降を試みた。結果として、ゲノムDNAは免疫沈降できたが、タンパク質は質量分析に使用できるほどの量を得ることができなかった。しかし、この目的を達成するためには、架橋剤の選択、架橋の条件設定、試料の破壊手順などの最適化が重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

dCas9を用いた部位特異的ChIP法では、sgRNAを変更するだけで、動物種や既存の抗体の質に縛られず、あらゆる遺伝子の、特異的なゲノム領域の解析に有効である。リコンビナントdCas9を用いた方法では、遺伝子導入の難しい細胞種や初代細胞を用いた解析への応用が期待できる。DNAを用いた解析では、極少量のDNAであっても配列を同定することが可能であるが、質量分析によるタンパク質の同定には、fmol～amolの量が必要であるため、効率の良いタンパク質回収法の確立は挑戦的であるが、意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Gene expression is regulated by transcription factor (TF). TFs-DNA complex organizes 3d structure of chromatin. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is useful for identifying binding sites of specific TFs, but it requires the identification of molecular targets in advance and can not examine single promoter regions. In this study, I evaluated a method to isolate site specific TFs by using the dead Cas9 (dcas9) system. I developed a viral vector-based method and a recombinant protein-based method and tried to immunoprecipitate TF complexes. Although genomic DNA could be immunoprecipitated, unfortunately, it was not possible to obtain sufficient quantities of the proteins in the TF complex to allow identification of new associated proteins by mass spectrometry. But I found that optimization of the choice of protein crosslinkers, setting of conditions of crosslinking and sample disruption procedures were crucial to achieve this objective.

研究分野：生化学

キーワード：部位特異的ChIP法 dCas9 共免疫沈降法 転写因子複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、単剤で奏功の得られる患者は約 20 %、併用でも約 50 % 程度と限定的である。その原因の一つとして、腫瘍微小環境 (TME) が注目されていた。腫瘍内に浸潤した腫瘍関連マクロファージ (TAM) は腫瘍局所で抗炎症性サイトカインを分泌して抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍増殖に適した微小環境の構築に寄与することから、ICI の効果増強のための有望な標的の一つであった。

2. 研究の目的

TAM においてサイトカイン遺伝子の発現制御に関わる転写因子複合体の構成タンパク質を同定することを当初の目的として実験を開始した。この転写因子複合体の構成タンパク質を標的として、複合体形成の阻害が抗炎症性サイトカイン分泌の特異的な抑制につながれば、ICI との併用による免疫増強効果が期待できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 質量分析法を用いたタンパク質の同定に十分な量の転写因子複合体構成タンパク質を共免疫沈降 (co-IP) 法によって回収する。

(2) dead Cas9 (dCas9) と一本鎖ガイド RNA (sgRNA) を用いた部位特異的クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、プロモーター/エンハンサーの特定領域のみを、結合しているタンパク質複合体を含めて回収する。

4. 研究成果

SWI/SNF 複合体は炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカインの遺伝子発現制御に関わる因子として知られている。そこで、SWI/SNF 複合体のサブユニットである Brm、BRG1 との共免疫沈降により、転写因子複合体の回収を試みた。しかしながら、タンパク質群の回収効率が 1 % 以下と十分でなく、複合体の構成タンパク質を同定する質量分析法に必要なタンパク質量を確保することが困難であった。また、SWI/SNF 複合体全体を標的にする方法では、特定の炎症性・抗炎症性サイトカイン遺伝子のプロモーター領域のみを特異的に解析することは不可能であり、新たな手法の開発が必要であった。

dCas9 と sgRNA の複合体は、ゲノム DNA の特定の領域に結合するため、部位特異的に ChIP を行うことが可能である。この手法では、sgRNA 配列を変更するだけで、動物種や既存の抗体の質に縛られず、あらゆる遺伝子の特異的な領域の解析に有効であると考えられている。この方法を転写因子複合体の共免疫沈降に応用するために、sgRNA とビオチン化 dCas9 を同時に発現するレンチウイルスベクターを構築した。dCas9 には BioTAP タグを融合し、内在ビオチン化酵素によるビオチン化を試みた。Jurkat 細胞、HEK293 細胞を用いて、感染効率とビオチン化 dCas9 の発現確認を行ったところ、どちらも問題なく遺伝子導入することができたが、Jurkat 細胞でしかビオチン化 dCas9 を検出することができなかった。培地中にビオチンを加えることにより HEK293 細胞でもビオチン化 dCas9 が検出可能になったことから、培地に含まれるビオチン濃度の違いが原因であると考えられた。

ビオチン化 dCas9 をストレプトアビジンビーズで回収した後、dCas9 の回収効率を推定するために dCas9 の溶出を試みた。しかしながら、ビオチン-ストレプトアビジンの結合力は非常に強力であるため、Laemmli サンプルバッファーを加えて 96 °C で 15 分加熱しても、回収効率は 1 % 以下であった。様々な条件を検討したところ、終濃度 30 mM のビオチンを加えて 96 °C で 15 分加熱することにより、回収効率が約 50 % に改善した。

次に、マウスのマクロファージ細胞への遺伝子導入法についても検討を行った。マウス脾臓細胞にレンチウイルスベクターで遺伝子導入を試みたところ、ほとんどの単球系細胞が死滅していた。これは、レンチウイルスによる TLR の活性化が原因であると考えられる。また、初代培養 T 細胞に対するレンチウイルスの導入効率も極めて低かった。一方で、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 由来 T 細胞へのレンチウイルスでの遺伝子導入効率は空ベクターであれば 60 % 以上であり、解析に十分であった。T 細胞上の免疫チェックポイント分子は免疫チェックポイント阻害剤の直接の標的であり、その発現制御に関わる転写因子複合体の全貌は未だ明らかになっていない。T 細胞への遺伝子導入ではウイルスベクターと使用することができ、*PDCD1* 遺伝子等のプロモーター領域については ChIP seq や ATAC seq のデータが利用できるため、部位特異的 ChIP 法開発のモデルの 1 つとして使用することにした。

初代培養 T 細胞に対する遺伝子導入効率を改善させるために、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を試みた。しかしながら、dCas9 を搭載したレンチウイルスベクターは、全く遺伝子導入できず、細胞株であっても恒常発現株を作ることができなかった。これは、dCas9 遺伝子のサイズが極めて大きいことが影響していると考えられた。dCas9 遺伝子全長を 1 つのレトロウイルスベクターで遺伝子導入することは困難であるため、2 つのレトロウイルスベクターに分割して遺伝子導入する等の方法は今後の検討課題である。

sgRNA とビオチン化 dCas9 を同時に発現するレンチウイルスベクターを用いた部位特異的 ChIP 法について、ゲノム DNA の回収効率を調べるために、マウスリンパ腫細胞株である EL4 細胞を用いて実験を行った。PDCD1 遺伝子のプロモーターを標的として部位特異的 ChIP 法によってゲノム DNA を回収し、qRT-PCR 法により回収効率を推定した。PDCD1 遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域等に複数の qRT-PCR 用プライマーを設計し、ゲノム DNA の検出を行った結果、sgRNA を設計した領域のゲノム DNA のみが特異的に回収できていることが確認でき、回収効率は約 3% であった (図 1)。また、エンハンサーであると予想されている部位のゲノム DNA は検出することができなかった。この原因の一つとして、転写因子複合体が壊れている可能性があり、複合体を保持したままクロマチンを回収する方法について改善する必要があると考えられた。

転写因子複合体の回収効率を調べるために、CCR4 遺伝子のエンハンサー部位と、そこに結合する転写因子の一部が同定されている成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) の細胞株 TL-Om1 細胞を用いて、CCR4 遺伝子のエンハンサー部位特異的な sgRNA とビオチン化 dCas9 による免疫沈降を行った。ウェスタンブロッティング法により転写因子複合体の検出を試みたところ、転写因子 IRF4 は検出することができたが、BATF3 は検出することができなかった (図 2)。転写因子複合体を保持することを目的として、架橋剤として DSP を用いて同様の実験を行ったところ、パラホルムアルデヒド (PFA) のみを使用した場合と比べてビオチン化 dCas9 そのものの回収効率が減少した (図 2)。このことから、本手法を用いて質量分析法による転写因子の網羅的同定や、CAPTURE 3C seq を行う上で、架橋剤の選択と架橋の条件設定等、サンプル調整法の最適化が極めて重要であることが示唆された。

遺伝子導入による実験のボトルネックを克服するために、大腸菌発現系で作製した dCas9 と人工合成した sgRNA を用いた部位特異的 ChIP 法の開発を試みた。ビオチンリガーゼを共発現できるプラスミドを用いて、大腸菌内で dCas9 をビオチン化できるよう発現プラスミドを再構築し、ビオチン化 dCas9 タンパク質を発現させて、回収することに成功した。TL-Om1 細胞を用いて、CCR4 遺伝子のエンハンサー部位特異的な合成 sgRNA とビオチン化 dCas9 による免疫沈降を試みたが、現在までに、転写因子の検出は達成できていない。本手法においても架橋剤の選択と架橋の条件設定等、サンプル調整法の最適化が極めて重要であると考えられ、これらは今後の検討課題である。

図 1

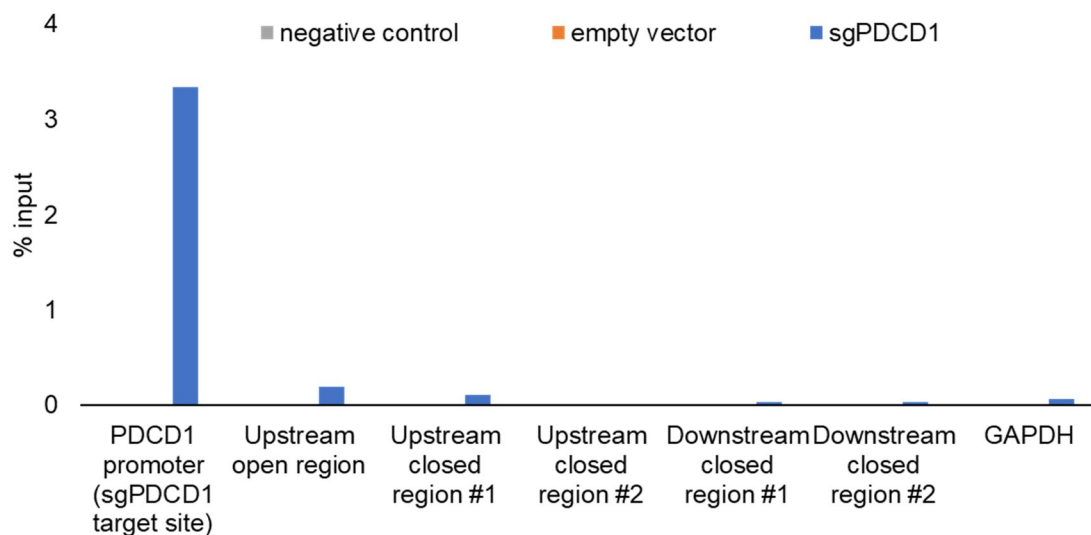
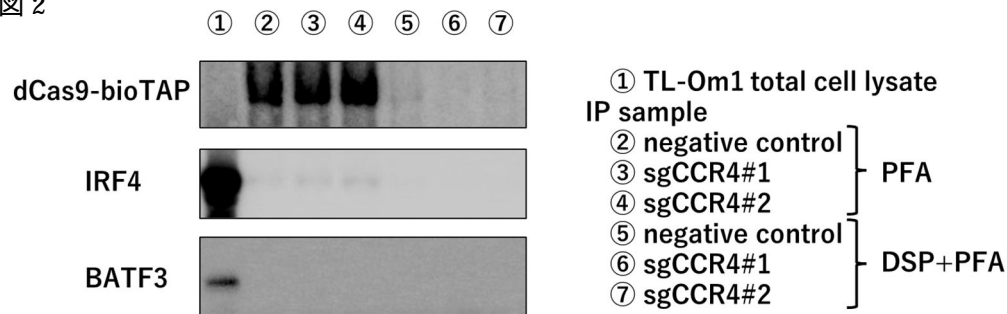


図 2



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