

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03171

研究課題名(和文)造血幹細胞移植による簡便ながん治療を可能とするデグロンシステムの開発

研究課題名(英文)Development of degron system for cancer therapy

研究代表者

成瀬 智恵 (Naruse, Chie)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30372486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的タンパク質を薬剤依存的に分解できる新しい方法であるプロテインノックダウン法(デグロンシステム)を用いて、培養細胞やマウスでPD-1を薬剤投与時にのみ分解できるシステムの確立を試みた。Jurkat細胞およびCD3陽性脾臓細胞に発現させたPD-1-SAMShタグ融合タンパク質は、薬剤の投与により分解された。MC-38腺癌細胞を移植したPD-1-mCherry-デグロンタグノックインマウスに薬剤を投与したところ、MC-38の増殖が抑制された。さらに、致死放射線照射後にKI骨髄細胞を移植した野生型マウスは、薬剤投与によって移植したMC-38細胞を排除することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物個体での内在性タンパク質に対するプロテインノックダウンシステムは、タグが致死性であることや、発現量の制御等の困難により、未だに困難である。本研究は、必要な時だけ特定のタンパク質を分解して減らすことのできるデグロンシステムによって、マウス生体内の内在性タンパク質を機能阻害できることを示した最初の例の1つであり、様々な生物現象や病気の治療法の研究などに応用することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established a system that can degrade PD-1 in a time-specific manner in cultured cells and mice using SMASH degron system. PD-1-SMASH fusion protein in Jurkat cells and CD3+ splenocytes was reduced by 1 day after administration of Asunaprevir (ASV) or Grazoprevir (GRV) that are NS3/4A protease inhibitors. Growth of MC-38 adenocarcinoma cells inoculated in PD-1-mCherry-SMASH knockin (KI) mice with ASV was repressed compared to wild-type (WT) and untreated KI mice. Moreover, the WT mice transplanted with KI bone marrow cells after being irradiated with lethal radiation could reject MC-38 cells with GRV. KI mice appeared healthy and showed no signs of autoimmune disease. We suggest that use of the degron system in living organisms is expected to advance not only various biological studies but the treatment of diseases.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス デグロン プロテインノックダウン PD-1

1. 研究開始当初の背景

がんの治療に関する研究は近年大きく進歩しており、特に、元来生物に備わる免疫力を最大限に利用してがんを排除しようとする免疫療法が注目されている。我々は免疫細胞の攻撃力を抑制するPD-1シグナル伝達経路を阻害する方法が、非常に効果的ながんを排除できることに注目した。免疫細胞上にあるPD-1は、標的となる細胞上に発現するPD-L1と結合すると、細胞傷害活性を抑制することが知られている。この機構は自己免疫疾患の発症を抑制しているが、がん細胞にPD-L1が発現していると免疫細胞が攻撃できなくなってしまう。そこで、現在行われている治療法が、抗PD-1抗体を投与してPD-1とPD-L1の結合を阻害する方法である。

しかしながら、抗体の投与は現時点で高額な医療費がかかり、再発した場合には同じ治療を繰り返す必要があるため、患者の負担が大きい。また、自己免疫疾患を防止する機能を抑制することから自己免疫疾患を発症する例があるため、長期に使用するには危険性が高いという欠点がある。そこで、免疫細胞上のPD-1を時期特異的に分解できるようなシステムが構築できれば、これらの問題点を解決できる新しい治療法開発につながるのではないかと考えた。我々はタンパク質の発現を迅速かつ可逆的に制御できる新しいシステムであるデグロンシステムに注目した。

デグロンシステムは、細胞が本来持つタンパク質分解システムを利用したタンパク質発現制御システムである(図1)。ユビキチン化されるとプロテアソームに輸送される配列を持つデグロンタグを、標的タンパク質に人工的に付加する。薬剤が添加されない時は、標的タンパク質とデグロンタグは分離するため標的タンパク質は安定に存在するが、薬剤が添加されるとデグロンタグが標的タンパク質に安定的に結合し、プロテアソームに輸送されて分解される。分解は薬剤の添加によって起こり、薬剤を除去すれば発現は元に戻る。タンパク質除去は遺伝子ノックアウトと異なり可逆的である。また、mRNAは除去されないので薬剤除去後のタンパク質回復も早い。研究開始までに、植物のオーキシンを添加するAIDシステムやLIDデグロンなど、様々なデグロンシステムが世界的に開発され、培養細胞での研究に広く用いられている

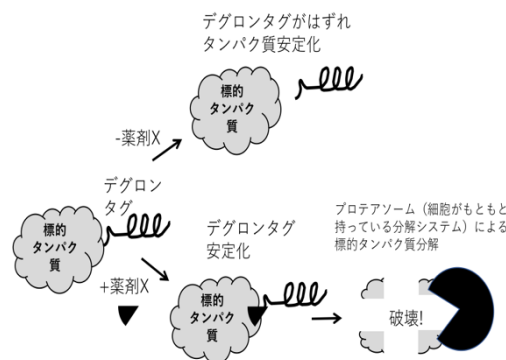


図1 本研究で使用するデグロンシステムの概要

(Nishimura et al. Nat Methods 2009, Natsume et al. Cell Rep 2016, Sathyan et al. Gene Dev 2019 など)。しかしながら、動物個体の内在性タンパク質に応用した例は未だなかった。また、医療応用を考えると、タンパク質分解の際に添加する薬剤は医療用に認可されたものが望ましいと考えられた。

2. 研究の目的

がん免疫療法の問題点(自己免疫疾患発症のリスク・再発対応)を克服したい。そこで、安価な医薬品を用いて免疫細胞上のPD-1を時期特異的に可逆的に分解できるデグロンシステムを導入したいと考えた。そのために、標的タンパク質を狙った時期に破壊するデグロンシステムを用いて、がん及び再発がんが簡便に治療できるシステムを、マウスにおいて開発することを目的とした。具体的な目標としては、(1)デグロンタグノックインマウスを用いて、PD-1を時期特異的に分解し、がんに対する細胞傷害活性を高めるシステムを構築する。(2)ゲノム編集によってin vitroで作製したデグロンタグノックイン造血幹細胞を野生型レシピエントマウスに移植することにより、レシピエントにおいてがんに対する細胞傷害活性を高めるシステムを構築するとした。

3. 研究の方法

本研究では、デグロンタグとして、ヒトC型肝炎ウイルスタンパク質を利用したSMAShタグを使用した。

(1) がん細胞を生体内で排除するシステムの構築

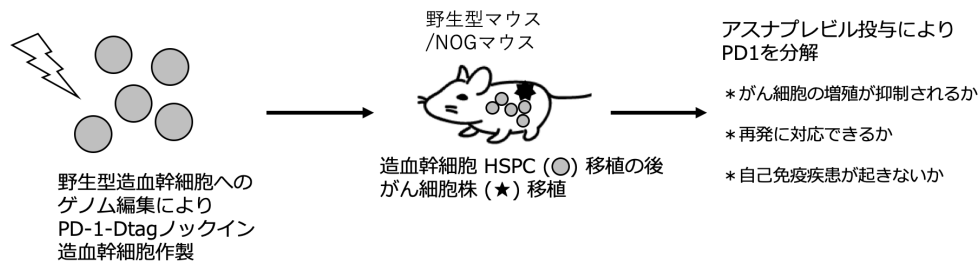


1) デグロンシステムを導入した T 細胞の in vitro 培養系での細胞傷害活性を測定した。PD-1-mCherry-SMASH/B6 マウスの脾臓細胞を培養に移し、BALB/c 脾臓細胞など標的として使用するがん細胞株と同じ H-2 型を持つアロ抗原によって活性化した。その後、アスナプレビルによって PD-1 を消失させた時の PD-L1 陽性がん細胞 (P-815/PD-L1 など) に対する細胞傷害活性を測定した。

2) 既に抗 PD-1 抗体による治療効果が確認されている MC-38 大腸がん細胞株を PD-1-mCherry-Dtag マウスに移植し、アスナプレビル投与の有無による in vivo での抗腫瘍活性を調べた。投与方法によるアスナプレビルの薬物動態をマウスで調べた結果、経口投与方法が最も血清中に長時間高濃度で留まることがわかっている (J pharmaceutical Sci, 2015)、経口投与方法を第 1 選択肢として、2点振って投与した。

3) 2)と同時に、アスナプレビルを投与した時の末梢血 T 細胞および、腫瘍内微小環境における PD-1 の発現量を、尾静脈から採取した血液を用いて FACS で継時的にモニターした。また、薬剤投与による抗腫瘍活性の変化について調べるため、微小環境内の細胞の種類や割合を、フローサイトメトリーにより解析した。さらに、薬剤投与により自己免疫疾患が引き起こされないかどうか、自己抗体の定量、血中サイトカインの定量および組織学的解析によって検討する。

(2) ゲノム編集を行った造血幹細胞の移植によるがん治療モデルの開発



ゲノム編集により野生型マウス造血幹細胞の内在性 PD-1 遺伝子下流に、PD-1 と融合タンパク質として発現するように SMASH タグの導入を試みた。しかしながら、造血幹細胞への SMASH タグ導入は困難であったため、ノックインマウスの造血幹細胞をレシピエントに移植することで、造血幹細胞移植による治療モデルの確立をゲノム編集法確立よりも優先させた。

4. 研究成果

Jurkat 細胞および CD3 陽性脾臓細胞に発現させた PD-1-mCherry-SMASH 融合タンパク質は、薬剤の投与により分解されたことから、SMASH および ASV を使用したタンパク質分解はマウスにおいて有効であることが確認できた (図 2)。

内在性 PD-1-mCherry-SMASH 融合タンパク質を発現するマウスの脾臓より細胞を回収し、in vitro 培養系での細胞傷害活性を測定したところ、アスナプレビル添加後の細胞ではアスナプレビル添加前よりも活性の上昇が認められた。

In vivo における細胞傷害活性を調べるため、MC-38 大腸がん細胞株を移植した PD-1-mCherry-SMASH マウスにアスナプレビルまたは同様の機能を持ち効果の高いグラソプレビルを投与した。その結果、MC-38 がん細胞株の増殖は野生型および無処置の PD-1-mCherry-SMASH マウスに比べて抑制され、再移植された細胞も排除できた。さらに、本実験で得られた結果が血液細胞依存的な現象であることの確認と、造血幹細胞の移植によるがん治療モデル作製の試みとして、致死放射線照射後に KI 骨髄細胞を移植した野生型マウスを用いて、同様の実験を行った。その結果、グラソプレビル投与によって移植した MC-38 がん細胞株を排除することができた。PD-1-mCherry-SMASH マウスは 1 年齢まで全てが生存し、大きな健康被害は認められなかった。

しかしながら、詳細な組織学的解析により軽度の自己免疫疾患が認められた。これは無処置 KI マウスにおいても PD-1 の減少があったためと考えられた。また、SMASH システムでは、薬剤を添加する以前よりタンパク質が約 50%に減少するリークが見られた。さらに、タンパク質分解が

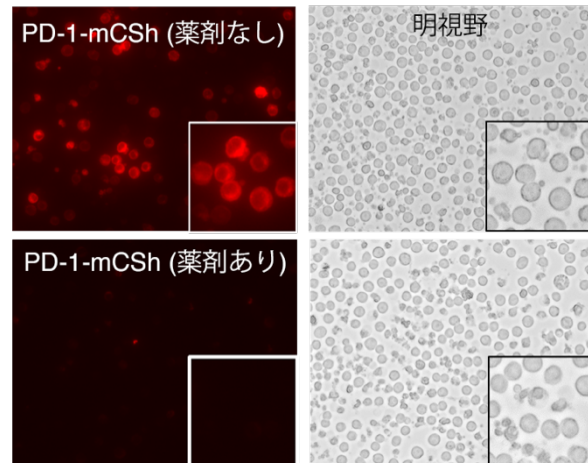


図 2 PD-1-mCherry-SMASH 融合タンパク質を強制発現させた Jurkat ヒト T 細胞株での mCherry (PD-1 と共に発現するようにした蛍光タンパク質) の発現変化。薬剤を加えると mCherry の発現は低下した。右下の枠内は拡大図。

最大約 40%程度, つまり, 野生型と比較して 20%程度と, 完全なノックダウンには至らないこと, 最大の分解量に至るまでに数日かかることがわかった。リークが起る原因は SMASh タグと標的タンパク質間のリンカーが最適でないことではないかと考え, in vitro で様々なリンカーを試した結果, リンカーの種類によってリークが抑制できることがわかった。しかしながら, リンカーの変更は分解効率の上昇にはつながらなかった。SMASh デグロンシステムをさらに改良し, 生体内で利用することで, 様々な生物学的研究のみならず, 病気の治療にもつなげられるよう今後の研究を進めたい。

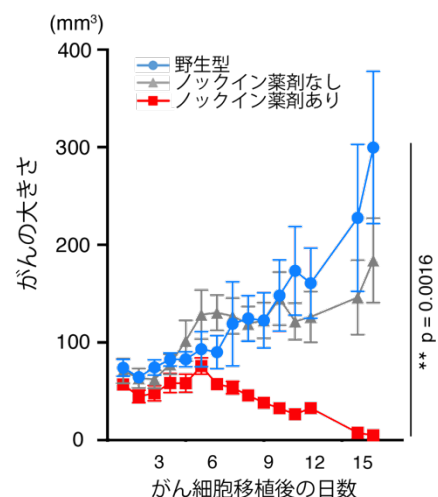


図3 ノックインまたは野生型骨髄細胞を移植した野生型マウスに MC-38 大腸がん細胞株を移植した。ノックイン血液細胞を持つマウスに薬剤を投与すると, 薬剤投与なしや野生型血液細胞を持つマウスに比べてがん細胞の増殖が抑制された。

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 Naruse C, Sugihara K, Miyazaki T, Pan X, Sugiyama F, Asano M.	4. 巻 4
2. 論文標題 A degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of tumor cells in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/narcan/zcac019	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 成瀬智恵, 杉原一司, パンシュチ, 宮崎龍彦, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 内在性PD-1へのデグロンタグ組込みによるマウス生体におけるがん細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第69回実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成瀬智恵, 杉原一司, パンシュチ, 宮崎龍彦, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 The SMASH degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of MC-38 tumor cells in mice.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成瀬智恵, 杉原一司, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 プロテインデグロンシステムによるがん免疫療法を用いたがん細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成瀬智恵、杉原一司、杉山文博、浅野雅秀
2. 発表標題 プロテインデグロンシステムによるがん免疫療法を用いたがん細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chie Naruse, Kazushi Sugihara, Fumihiro Sugiyama, Masahide Asano
2. 発表標題 Suppression of cancer cell growth in mice with a degron system.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chie Naruse, Kazushi Sugihara, Xuchi Pan, Tatsuhiko Miyazaki, Fumihiro Sugiyama, Masahide Asano
2. 発表標題 The SMASh degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of MC-38 tumor cells in mice.
3. 学会等名 IMGC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

必要な時だけ標的タンパク質を壊すがん治療 薬剤投与によるマウス内在性PD-1の分解
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-06-20-0>

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	杉原 一司 (Sugihara Kazushi) (10377418)	京都大学・医学研究科・技術職員 (14301)	
研究分担者	浅野 雅秀 (Asano Masahide) (50251450)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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