

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16433

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害療法最適化のための新規エピゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel epigenetic editing technology for the immune checkpoint therapy of cancers

研究代表者

渡邊 俊之（Watanabe, Toshiyuki）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：10843435

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）：多くの癌はNLRC5プロモーターのメチル化により、NLRC5およびMHC class I 遺伝子の発現を低下させ、免疫応答から逃れている。我々は酵素活性を欠損させたCas9(dCas9)と脱メチル化酵素TET1にNLRC5プロモーター特異的なgRNAを組み合わせることにより、NLRC5遺伝子特異的に脱メチル化を誘導する事に成功した。さらに転写活性化因子をシステムに加えることにより、さらなる転写誘導効率の大きな上昇に成功した。これらの遺伝子特異的なエピゲノム編集による免疫療法は、肺癌のみならず、多くの癌腫、及び多くの標的遺伝子に応用可能であり、汎用性が高い技術と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌におけるDNAメチル化は以前よりよく知られている。実際に脱メチル化を行う薬剤が癌治療に使われてきている。しかしながら従来の脱メチル化剤は、特異性が低く副作用が大きいため、臨床応用が難しく、ごく限られた癌腫にのみ適用がある。遺伝子特異的な脱メチル化技術は副作用が低いことが期待される上、数多くの標的遺伝子を選択することができることから、多くの癌腫に応用可能であり、これから多くの治療技術の基盤技術となる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：It has been demonstrated that many cancers escape from the human immune system by reducing MHC class I expression via promoter methylation of NLRC5 gene, a master coactivator of MHC class I genes. By employing defective Cas9 (dCas9) and demethylating enzyme TET1, we have succeeded in introducing demethylation on the promoter of NLRC5, and subsequent induction of NLRC5 and MHC class I genes. We could further enhance the expression level by appending the transactivator components which activates promoter in the gRNA-based sequence specific manner. These technologies are not only useful for lung cancer treatments but also other cancers and non-cancerous disorders.

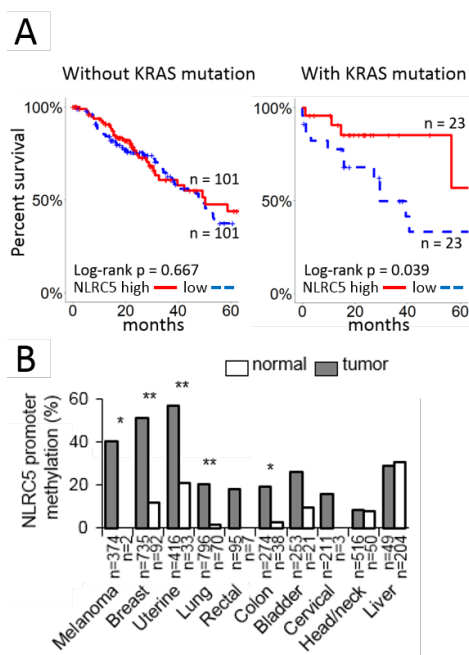
研究分野：免疫学

キーワード：MHC class I NLRC5 promoter DNA methylation

1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本人の死因となる癌腫第一位となり、健康保険制度、国家的経済に大きな負担をもたらしている。肺癌は組織学的所見により小細胞肺癌と非小細胞肺癌(NSCLC)に分類される。NSCLCでは、EGFRやKRASといった遺伝子の変異が高頻度に見られ、その結果、細胞増殖・成長が過剰におき癌化が誘導されている。NSCLCの基本的治療法として手術・放射線・化学療法が長らく行われてきたが、生命予後は不良であり、新たな治療方法が望まれてきた。近年、NSCLCに対する新規治療法として免疫チェックポイント阻害剤(ICI)が承認され、使用症例は急増している。癌に対する免疫応答の中心は、CD8+T細胞がT細胞受容体(TCR)を介して、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class I(MHC-I)が提示する癌抗原を異物として認識し、癌細胞を抹消することである。一方、癌細胞は自身の生存のために、T細胞などの免疫担当細胞の機能を抑制し、宿主の免疫応答から逃れるという免疫逃避機構を有する。ICIは主に癌細胞からT細胞への抑制性シグナルを妨げることにより、T細胞の抗腫瘍効果を高めている。NSCLCにおいてICIが著効する症例もあるが、全体の約80%の症例で無効であり(抗Programmed cell death(PD)-1抗体ニボルマブの場合)、効果は十分とはいえない(Borghaei, et al. N Engl J Med 2015)。その一因として現在のICI療法が、免疫系を賦活化させることに重きを置いており、治療対象である癌細胞がどのように免疫系から逃れているかに対応できてないことが挙げられる。

癌免疫応答においては、MHC-Iが細胞内癌抗原をCD8+T細胞へ提示し、同細胞を活性化させる機序が必須である。我々のグループはNOD-like receptor family CARD domain containing 5(NLRC5)がMHC-I遺伝子転写活性化因子である事、NLRC5がCD8+T細胞活性化に必要であることを明らかにした(Meissner, Kobayashi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010)。癌とNLRC5の関連について、21種類の固形癌約8000検体と正常組織約3000検体を比較したところ、NLRC5の発現レベルが低下しているほど生命予後が不良であった(Yoshihama, Kobayashi et al. Trends Cancer 2017)。また、NSCLCにおけるNLRC5の発現と予後、およびKRAS変異について解析したところ、KRAS変異をもつNSCLC患者でのみNLRC5の発現レベルが5年生存率に関わっていた(図1A)。さらに各癌種では、NLRC5プロモーターのDNAメチル化、コピー数低下、体細胞変異によりNLRC5の発現が低下し、その結果、MHC-Iによる癌抗原提示が負に制御されていることを明らかにし、特にNLRC5プロモーターのメチル化がNLRC5の発現を強く制御していた(図1B)(Yoshihama, Kobayashi et al. Proc. Natl. Acad. Sci.



(図1)悪性腫瘍とNLRC5
A NSCLC(KRAS 変異あり)において、NLRC5 低発現群で生命予後不良である。
B 各種悪性腫瘍で NLRC5 プロモーターのメチル化が亢進している。*p<0.05, **p<0.01

USA 2016)。

2. 研究の目的

NLRC5 プロモーターの脱メチル化により、NLRC5 が正常に発現し、MHC-I を介した CD8+T 細胞の抗腫瘍効果が得られ、ICI の効果が上昇すると考える。本研究の目的は、NSCLC を対象に *in vitro* および *in vivo* において、CRISPR/Cas9 システムにより NLRC5 プロモーターの脱メチル化を誘導し、MHC-I 抗原提示の正常化と ICI 治療効果を高め、将来的な新規治療戦略の可能性を探ることにある。

3. 研究の方法

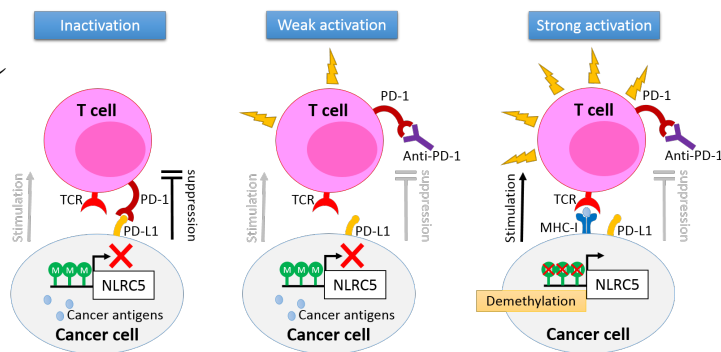
NLRC5 を標的遺伝子として、CRISPR/Cas9 を応用した特異的脱メチル化技術を開発を目指した。既に我々は、①酵素活性を欠損させた Cas9(dCas9)と TET1 を融合させた発現ベクター(dCas9-TET1)、②遺伝子特異的ガイド RNA 発現ベクター(sgRNA)、③sgRNA 特異的に結合する MS2 coat protein と TET1 を融合させた発現ベクター(MS2-TET1)を作製した。このシステムでは最大 5 分子の TET1 が導入され、広範囲に脱メチル化が誘導できる(図 3A)。

予備実験として、5-Aza を H522 に添加したところ、NLRC5 および MHC-I の発現が亢進した(図 3B)。また、H522 の NLRC5

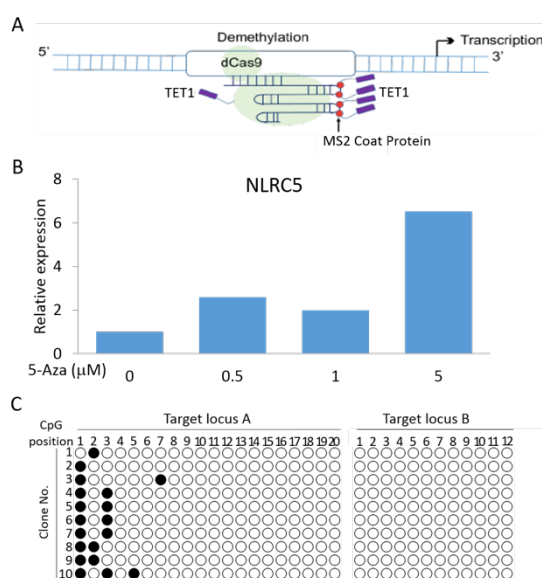
プロモーターにおけるメチル化領域をバイサルファイトシーケンス法(BSP)により確認したところ、メチル化は一部の領域に限定されていた(図 3C)。従って、1)sgRNA シーケンスの最適化、2)複数の sgRNA の使用、3)他の脱メチル化酵素の単独・同時使用により DNA 脱メチル化効率を最大限に高める技術を開発する。さらに *in vivo* への応用のために、KRAS 変異(G12C)をもつマウス肺癌細胞株(LLC)を用いて H522 同様の実験を行い、脱メチル化の最適化を目指した。

4. 研究成果

dCas9 を用いた脱メチル化の最適化に成功した。さらに、p65 などの transcriptional activator を MS2 coater を介して加える事により、さらなる MHC class I 発現の誘導に成功した。同じ技術を用いた B16melanoma 細胞株においては、gRNA 特異的な脱メチ



(図 2)NLRC5 プロモーターメチル化と抗 PD-1 抗体療法
NLRC5 プロモーターの脱メチル化により癌免疫逃避機構を解除し、免疫チェックポイント阻害薬の有効性を高める(仮説)。



(図 3) NLRC5 プロモーターのメチル化と脱メチル化
A dCas9 と脱メチル化酵素(TET1)がガイド RNA によってメチル化部位に結合する。
B 5-Aza により H522 の NLRC5 発現が上昇する。
C H522 における NLRC5 プロモーターのメチル化は特定の領域に局在している。○非メチル化 CpG、●メチル化 CpG

ル化に成功し、移植モデルにおいて、遺伝子特異的脱メチル化が癌治療に応用可能である事が示された。今後さらに、肺癌を中心とした *in vivo* での治療、特に免疫チェックポイント阻害剤との併用との効果について検討を進めていく予定である。

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
研究協力者	小林 弘一 (Kobayashi Koichi) (60817162)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

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