

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03613

研究課題名(和文)自己免疫疾患のエピゲノム編集による新たな治療戦略

研究課題名(英文)A new therapeutic strategy for autoimmune diseases through epigenome editing

研究代表者

畑田 出穂(Hatada, Izuho)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：50212147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：安定な制御性T細胞を作製するためには強力なエピゲノム編集技術が必要である。そこでこれまで開発したTETをリクルートするSunTag法を改良しTETに加えてVP64をリクルートすることによりより強力なエピゲノム編集をおこなうことができた。すなわちdCas9-SunTag、scFv-TETに加えて別のエピゲノム因子と融合した抗GCN4ペプチド抗体(scFv-X)を用いると、TET1とFactor Xの両方を単一のsgRNAで標的にリクルートすることができ、標的遺伝子を相乗的に活性化させることができた。特にXとしてVP64を用いたときに最も相乗効果が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は自己免疫疾患の多くに適用できる可能性があるとともに、特定の遺伝子を特異的にねらったエピゲノム療法という新たな治療戦略を提供する。この戦略は遺伝子の発現量を回復させることにより治療できる様々な疾患に応用可能である。また遺伝子治療と異なり一過性の遺伝子発現あるいはリコンビナントタンパク質の導入でも治療は可能であるので遺伝情報自体は変化せず、従来の遺伝子治療と比較して安全である。

研究成果の概要(英文)：A powerful epigenome editing technique is required for the generation of stable regulatory T cells. For that purpose, we improved the SunTag method to recruit VP64 in addition to TET, which has been developed so far, and were able to perform more powerful epigenome editing. In other words, dCas9-SunTag and scFv-TET plus an anti-GCN4 peptide antibody (scFv-X) fused to another epigenomic factor allowed both TET1 and Factor X to be recruited to their targets with a single sgRNA, thus synergistically activating the target genes. In particular, the most synergistic effect was achieved when VP64 was used as X.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピゲノム ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞は、免疫自己寛容の維持、免疫応答の抑制的制御の中枢である。この細胞を除去すると、甲状腺炎、糖尿病など様々な自己免疫病が自然発症する。Foxp3 は、正常 T 細胞で発現させると、機能、表現型の点で内在性制御性 T 細胞と同等の制御性 T 細胞に転換できることから制御性 T 細胞のマスター遺伝子であると考えられている。このことは小児の免疫不全疾患である IPEX 症候群の責任遺伝子は FOXP3 であるところからも裏づけられる。この疾患では高頻度に I 型糖尿病、甲状腺炎、炎症性腸疾患、重篤なアレルギーを発症する。FOXP3 の発現は実際に自己免疫疾患で重要な働きをしており、例えば Systemic sclerosis ではエピゲノムの変化と FOXP3 の発現減少が観察されている。未熟な T 細胞から TGFbeta と抗原刺激により FOXP3 発現する制御性 T 細胞類似細胞を誘導できるが、FOXP3 の発現は安定ではない。それはエピゲノムが制御性 T 細胞と異なるからである。

エピゲノムとは遺伝子の修飾であり遺伝子のスイッチの役割を果たすとともに細胞分裂後も維持されスイッチの状態が継承される。代表的なエピゲノムである DNA のメチル化は遺伝子の発現を抑制するが、制御性 T 細胞では FOXP3 が脱メチル化されている。それに対して TGFbeta で誘導して作製した制御性 T 細胞類似細胞では FOXP3 はメチル化されており、FOXP3 発現は不安定である。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞の機能異常や不足は、自己免疫疾患や炎症性疾患の原因となる。制御性 T 細胞類似細胞は未熟な T 細胞から TGFbeta により誘導できるが、エピゲノムが安定しないため一過的である。そこでエピゲノムを操作する技術の開発が求められる。そこでこれまでに開発してきたエピゲノム編集技術の改良をおこない、より強力に遺伝子活性化をおこなえる技術の開発をおこなう。

3. 研究の方法

これまで脱メチル化法として知られていたのは DNA メチル基転移酵素の阻害剤であるアザシチジンである。しかしこれによる脱メチル化はすべての遺伝子を非特異的に脱メチル化することから安全性に問題があった。そこで我々は特定の遺伝子をゲノム編集技術を利用して脱メチル化するエピゲノム編集技術の開発をおこなってきた¹。CRISPR/Cas ゲノム編集法は Cas9 タンパク質が標的遺伝子の一部の配列を組み込んだガイド RNA (gRNA) と複合体を形成し標的遺伝子を切断、破壊する技術である。我々は遺伝子切断活性をなくした Cas9 (dCas9) と、DNA の脱メチル化の最初の反応を起こす酵素 (TET) を直結し、TET の活性を標的遺伝子にリクルートしたが、十分に発現を活性化できなかった。そこで、脱メチル化能力を向上させるため、(1) dCas9 の端に短い目印のアミノ酸配列 (GCN4) を複数個つないだもの (dCas9-SunTag) と (2) GCN4 を認識して結合するミニ抗体に TET をつなげたもの (scFv-TET) を同時に細胞に導入して新規複合体を構成させる方法を開発した。それにより特定の遺伝子に複数の TET が作用し、効率的に脱メチル化し遺伝子発現を十分に上昇させることができた。本研究では、このシステムをさらに発展させ TET に加えて複数のエピゲノム因子を用いることにより、より強力に遺伝子活性化をおこなえる技術の開発をおこなった。

4. 研究成果

dCas9-SunTag、scFv-TET に加えて別のエピゲノム因子と融合した抗 GCN4 ペプチド抗体 (scFv-X) を用いると、TET1 と Factor X の両方を単一の sgRNA で標的にリクルートすることができ、標的遺伝子を相乗的に活性化させることができるはずである。そこで、このフォーマットを用いて、TET1 と併用した場合に、遺伝子発現を相乗的に活性化する他の因子を探索した。Factor X としては、転写因子 (VP64、p65HSF1)、コアクチベーター (p300)、SWI/SNF リモデリング因子 (SS18)、ヘテロクロマチンリラクサー (GADD45A)、パイオニア因子 (FOXA1、PU.1) を用いた。これらについて標的として 10 個の遺伝子について遺伝子活性化を検討した²。TET と他の因子との相乗効果を調べた結果、7 つの因子すべてが TET と何らかの相乗効果を示した。その中で、VP64 が最も優れた結果であった。すなわち TET1 のみを用いた SunTag システムでは、1.5 倍から 78 倍の発現活性化が得られた (平均 20 倍)。一方、TET と VP64 を用いた SunTag システムでは、3.5 倍から 1139 倍の発現活性化が得られた (平均 212 倍)。調べた 10 個の遺伝子のうち 8 個では、TET1 と VP64 の相乗効果が 1.8 倍から 21 倍の割合で観察された (平均 6.5 倍)。転写因子 p65HSF1 は、調べた 10 個の遺伝子のうち 5 個で TET との相乗効果を示した。その他の因子が TET との相乗効果を示したのは 3 遺伝子以下であった。このように、他の因子と比較すると、転写因子の方がより強い相乗効果が得られ特に VP64 は相乗効果が強いことがわかった。

引用文献

1. Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I.

Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions.

Nature Biotechnology 2016 Oct;34(10):1060-1065. doi: 10.1038/nbt.3658.

2. Morita S, Horii T, Kimura M, Hatada I. Synergistic Upregulation of Target Genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag Platform.

Int J Mol Sci. 2020 Feb 25;21(5). pii: E1574. doi: 10.3390/ijms21051574. PubMed PMID: 32106616; PubMed Central PMCID: PMC7084704.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Gailhouste Luc, Liew Lee Chuen, Yasukawa Ken, Hatada Izuho, Tanaka Yasuhito, Nakagama Hitoshi, Ochiya Takahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Differentiation Therapy by Epigenetic Reconditioning Exerts Antitumor Effects on Liver Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1840 ~ 1854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2018.04.018	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 -
1. 著者名 Morita Sumiyo, Horii Takuro, Hatada Izuho	4. 巻 1767
2. 論文標題 Editing of DNA Methylation Using dCas9-Peptide Repeat and scFv-TET1 Catalytic Domain Fusions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 419 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7774-1_23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gailhouste L, Liew LC, Hatada I, Nakagama H, Ochiya T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Epigenetic reprogramming using 5-azacytidine promotes an anti-cancer response in pancreatic adenocarcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0487-z.	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 該当する
1. 著者名 Morita S, Horii T, Kimura M, Hatada I.	4. 巻 21(5)
2. 論文標題 Synergistic Upregulation of Target Genes by TET1 and VP64 in the dCas9-SunTag Platform.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E1574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051574	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 -

1. 著者名 Horie T, Morita S, Hino S, Kimura M, Hino Y, Kogo H, Nakao M & Hatada I.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Successful generation of epigenetic disease model mice by targeted demethylation of the epigenome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-020-01991-8.	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 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hatada I
2. 発表標題 Epigenome and genome editing of mammals
3. 学会等名 Genome Editing Towards Medicinal Applications (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畑田出穂
2. 発表標題 Epigenome and genome editing of mammals
3. 学会等名 第9回武田科学振興財団薬科学シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Morita S, Horie T, Hatada I.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 288
3. 書名 Editing of DNA Methylation Using dCas9-Peptide Repeat and scFv-TET1 Catalytic Domain Fusions. Morita S, Horie T, Hatada I. Methods Mol Biol.	

〔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	堀居 拓郎 (Horii Takuro) (00361387)	群馬大学・生体調節研究所・准教授 (12301)	
研究分担者	森田 純代 (Morita Sumiyo) (40589264)	群馬大学・生体調節研究所・助教 (12301)	
研究分担者	澁谷 海大 (Shibutani Mihiro) (70786839)	群馬大学・生体調節研究所・研究員 (12301)	削除：平成29年11月30日