

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19617

研究課題名(和文)免疫回避機構の網羅的探索

研究課題名(英文)Genome-wide screening for genes involved in immune escape

研究代表者

土井 知光(DOI, Tomomitsu)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：70437218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノムワイドCRISPR/Cas9ノックアウトライブラリーを用いて、腫瘍の免疫回避遺伝子の網羅的スクリーニングをマウス個体内で行った。得られた候補遺伝子の多くは、検証のために個々に作成したノックアウト細胞では、ライブラリーでの濃縮効果が再現されなかった。腫瘍内のクローン間の競合や、ノックアウトに依存しないクローン内の多様性が原因として想定され、生体内で行うライブラリースクリーニングの課題を提示する事が出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術の登場により、全遺伝子を標的として、破壊による機能解析が可能となった。しかし、多くのスクリーニングは試験管内で行われていて、生体内における機能を必ずしも反映していない。本研究では、腫瘍の免疫回避機構をマウス個体内で行った。結果的に、ノックアウト遺伝子が効率よく濃縮されなかったが、今後、生体内でライブラリースクリーニングを行う際の課題を提示できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted a comprehensive screening for tumor immune escape genes in mice using a genome-wide CRISPR / Cas9 knockout library. Many of the obtained candidate genes could not reproduce the enrichment effect seen in the library in knockout cells individually prepared for validation. The competition between clones in the tumor and the variation within the clone that did not depend on gene knockout were assumed to be the cause, and it could be the task(s) to be solved for future library screening in vivo.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：免疫チェックポイント CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法はがん細胞が持つ免疫回避機構(免疫チェックポイント)のために、これまで思うような効果が示されてこなかった。従って、がん治療を考える上で、がん免疫における免疫チェックポイント機構を理解することはきわめて重要である。近年、抗PD-1 抗体を始めとするチェックポイント阻害剤の登場で免疫療法に対する評価が一変し、がん治療のパラダイムシフトが起こりつつある。例えば、抗PD-1 抗体療法は進行性の非小細胞肺癌、メラノーマ、腎細胞がんに対して18～28%というこれまで考えられなかったような奏効率を上げている。しかし一方で、残りの70～80%の患者では効果が見られないことが問題となっている。効果が見られない原因の一つとして、PD-1 経路以外の免疫チェックポイントが働いている可能性が考えられている。免疫チェックポイントはがん細胞が免疫監視を逃れる方法である以前に、自己が免疫系によって傷害されないための恒常性維持機構であり、まだ完全には理解されていない。またチェックポイント阻害治療は間質性肺炎や重傷筋無力症などの重篤な副作用を引き起こす患者が10%程度存在し、効果の個人差が大きい治療法である。そこで他の免疫チェックポイントが明らかにできれば、個人に合わせて副作用の小さな治療法を選択できる可能性がある。抗CTLA-4 と抗PD-L1の併用療法では更に高い治療効果が得られていることから、組み合わせの選択肢が増えることは、これまで効果が見られなかった患者に新たな治療法が提供できるだけでなく、更に強力な治療法を提供できることにつながることを期待される。

2. 研究の目的

免疫チェックポイントはがん細胞が免疫監視を逃れる方法である以前に、自己が免疫系によって傷害されないための恒常性維持機構であり、まだ完全には理解されていない。そこで本研究では、ゲノムワイドノックアウトライブラリーを、実験動物生体内でスクリーニングする手法を確立し、免疫チェックポイントに關与する免疫系及びがん細胞の因子を網羅的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CRISPR / Cas9 を使用するマウスの全ゲノムに対応した遺伝子ノックアウト型のCRISPR/cas9 レンチウイルスライブラリー (GeCKO v2 mouse pooled library Addgene) を導入し、これらのライブラリーから高濃度のウイルスライブラリーを作成した。

作成したウイルスライブラリーをB16マウスメラノーマ細胞にMOI=0.5になるように感染させ、ライブラリーの多様性が毀損されないような培養スケールを維持した上で、感染細胞をピューロマイシンで選択し、B16ノックアウトライブラリーを作成した。

作成したB16ノックアウトライブラリーを、B16親株をコントロールとして、免疫が正常な野生型マウス皮下に投与し、腫瘍が成長するまで観察を行った。

腫瘍成長後、安楽死させたマウスから腫瘍を切除し、コラゲナーゼで細胞を分散させた後、短期間培養を行い、生体内で選択されたB16ノックアウト細胞の回収を行った。

マウス投与前後のB16ノックアウトライブラリーからゲノムDNAを精製し、PCRでガイドRNA配列の回収を行い、次世代シーケンサーを用いて解析を行い、生体内で濃縮されたガイドRNAの検討を行った。

また、選択後B16ライブラリーを再び、マウスに投与し、生体内での選択を複数回、繰り返した後、腫瘍形成能が亢進したB16クローンを複数取得し、クローンのガイドRNAをPCRで回収後、

通常のサンガーシーケンサーで解析を行った。

得られた候補遺伝子に対するガイドRNAの作用を確認する為に、これらのガイドRNAを導入したCRISPR/Cas9レンチウイルスを個々に作成し、B16細胞に感染させ、ノックアウト細胞株を作成し、マウスでの腫瘍形成能の検討を行った。

4. 研究成果

B16 ノックアウトライブラリー及び、B16 親株をそれぞれ、10匹のマウスに投与し、腫瘍の成長を観察したところ、ノックアウトライブラリーを投与した複数のマウスで、親株より腫瘍が大きく成長した。このことから、ライブラリー内に腫瘍の成長が有利、又は免疫回避能が亢進した細胞が含まれることを示唆していると考えられた。

また、安楽死後のマウスから腫瘍を摘出したところ、親株では免疫系からの攻撃の為に、腫瘍塊が軟化していたのに対し、ノックアウトライブラリーを投与した複数の腫瘍で、腫瘍塊の硬化が見られた。

切除した腫瘍から回収した B16 細胞に含まれるガイド RNA を次世代シーケンサーで解析後、配列毎にクラスタ化し、各配列のコピー数を検討したところ、投与前のガイド RNA には特定の配列の濃縮は見られなかったのに対し、選択後には、複数の配列が濃縮されていた(図)。

濃縮ガイド RNA の標的遺伝子を検討したところ、免疫の調節や転写制御に関わる遺伝子を複数得る事が出来た。

また、選択後の B16 ライブラリーは、再び、マウスに接種を繰り返す事で、親株に対して、腫瘍形成能の高いクローンを複数得る事が出来た。これらのクローンから同様に PCR で挿入されているガイド RNA を回収し、配列を同定した。

上記実験で得られた候補遺伝子に対するガイド RNA を個々に持つ CRISPR/Cas9 レンチウイルスを用いてノックアウト B16 を作成し、マウスでの腫瘍形成能を再検討した。その結果、多くの候補遺伝子で、ライブラリーでの結果が再現されなかった。

以上の研究により、生体内での選択により、ノックアウトライブラリーから、親株と異なる性質のクローンが取得できた。しかし、多くの候補配列において、個々にノックアウトした場合に、再現される確率は高くない事がわかった。この原因として、2つの可能性が考えられる。1つは、ライブラリーでは、複数のクローンが含まれる為、他のクローンとの競合が生じるが、単クローンの再現実験では、競合が生じない為、ライブラリーと異なる結果が得られた可能性が考えられる。もう一つは、用いた B16 細胞のクローン内の性質の多様性が、ノックアウトの効果より、大きい可能性が考えられる。この場合、挿入されたガイド RNA に依らず、細胞が選択される為、効率よく、ライブラリーの選択が出来ない。

本研究によって、ゲノムワイドノックアウトライブラリーの生体内におけるスクリーニングにおいて、クローン間の競合と、クローン内の性質の多様性と言う課題が提示された。今後、これらの課題を解決する事で、効率の良い生体内ライブラリースクリーニング法が確立されると考える。

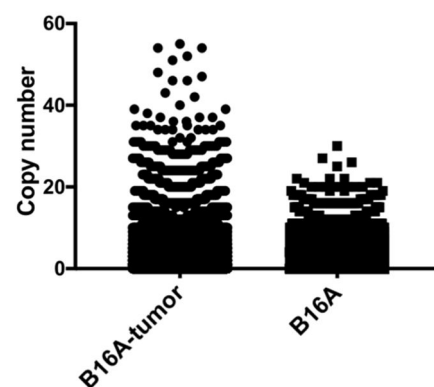


図 腫瘍(B16A-tumor)及び接種前ノックアウトライブラリー (B16A) から回収されたガイドRNA配列のコピー数。

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 0件）

1. 著者名 Takeuchi Masahiro, Doi Tomomitsu, Obayashi Kunie, Hirai Ayako, Yoneda Kazue, Tanaka Fumihiko, Iwai Yoshiko	4. 巻 196
2. 論文標題 Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunology letters	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2018.01.007	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 -

〔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
研究分担者	岩井 佳子 (Yoshiko IWA1) (90362467)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	