

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19269

研究課題名(和文) デグロンシステム導入マウスを用いた新規がん治療システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of a novel cancer therapy using degron system in mice

研究代表者

浅野 雅秀 (Asano, Masahide)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50251450

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)：マウス個体において免疫細胞上のPD-1を時期特異的に分解できるようなシステムを構築した。PD1-mCherry-デグロンタグ融合タンパク質を発現するホモ接合ノックインマウスに薬剤を投与したときに、がん細胞の増殖が抑制された。また、ホモ接合体の骨髄細胞を移植した野生型マウスに薬剤を投与した場合でもがん細胞の増殖が抑制された。薬剤を投与しない場合や、野生型マウスに他の野生型マウスの骨髄を移植した場合にはがん細胞の増殖は抑制されなかった。また、PD-1ノックインマウスの組織学的解析を詳細に行った結果、軽微な自己免疫疾患の発症が認められたが、大きな健康被害はないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デグロンシステムを動物個体の内在性タンパク質に応用した例はこれまでになかったが、本研究では初めて、動物個体の内在性タンパク質の分解に使用できることを示した。よって、これまでのドキシサイクリン投与などを用いた実験系よりも毒性が少なく、また薬剤に対する応答が早い、新しい解析手法の提案ができたと考えられる。また、ヒトや家畜への造血幹細胞移植により、がんの治療が容易になる方法が開発できる可能性がある。本研究で用いたデグロンシステムにはリークが認められたため、さらなる改良が必要となるが、薬剤の投与をしなれば標的タンパク質PD-1は正常に発現していると考えられるので、安全性も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a degron system for the time-specific degradation of PD-1 on immune cells in animal body and found that cancer cell growth was inhibited when the drug for the degron system was administered to homozygous knockin (KI) mice expressing PD1-mCherry-degron tag fusion protein. The growth of cancer cells was also inhibited when the drug was administered to wild-type mice transplanted with KI bone marrow cells. Cancer cell growth was not suppressed when no drug was administered or when wild-type mice were transplanted with bone marrow from other wild-type mice. Histological analyses of the PD-1 KI mice showed development of minor autoimmune diseases, but no major health problems were observed until 4-5-month-old.

研究分野：実験動物学

キーワード：デグロン PD-1 マウス

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、効果の高さと副作用の低さから注目されている。がん免疫療法は大きく分けて、(1)がん細胞特異的に発現するタンパク質を認識する T 細胞を導入する方法、(2)免疫細胞の攻撃力を抑制するシグナル伝達経路を阻害する方法がある。

我々は(2)免疫細胞の攻撃力を抑制するシグナル伝達経路を阻害する方法が非常に効果的にがんを排除できることに注目した(図1)。免疫細胞上にある PD-1 受容体は PD-L1 タンパク質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 が発現しているとがん細胞を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、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、抗 PD-1 抗体投与により、がん細胞のみならず正常細胞をも傷害してしまい、自己免疫疾患を発症する例がある。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、これらの問題を解決する新しい治療法開発につながるのではないかと考えた。デグロンは細胞が本来持つタンパク質分解システムを利用して、人工的にデ

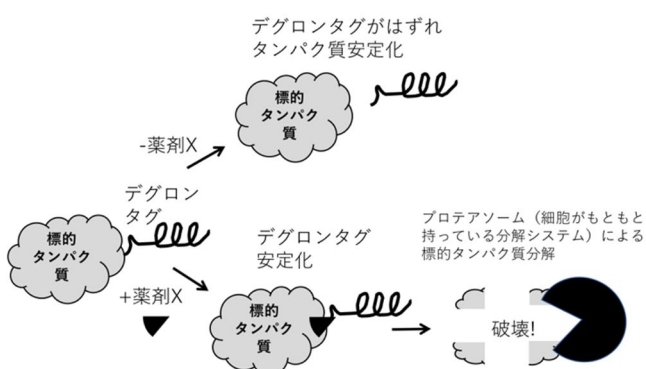


図1 本研究で用いたデグロンシステムの概要

グロンタグを付加したタンパク質を、薬剤の添加により分解するシステムである(図1, Chung et al. Nat Chem Bio. 2015)。これまでに植物のオーキシンを添加する AID システムなど(Nishimura et al. Nat Methods 2009)が開発され、培養細胞での研究に用いられているが、動物個体に応用した例は研究開始当時報告されておらず、内在性タンパク質に使用した例は現在も未報告である。

2. 研究の目的

本研究では、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単に治療できるシステムをマウスモデルで開発することを目的とする。このシステムを免疫細胞に導入して PD-1 タンパク質の量を制御することができれば、デグロンシステムを活性化する薬剤を投与することによって、がん細胞を効率的に攻撃する免疫細胞ができると考えた。さらに、造血幹細胞にこのシステムを導入することができれば、再発時にも薬剤の投与のみで治療可能となり、患者への負担が軽減されると考えた。なお、本研究のデグロンシステムで用いる薬剤は既に医薬品として用いられているものであり、臨床応用も期待できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞でのデグロンシステムの機能確認

マウス T リンパ腫由来 EL4 細胞、またはヒト T 細胞性リンパ腫由来 Jurkat 細胞に、マウス PD-1-mCherry-デグロンタグ融合タンパク質を発現させ、細胞内局在を調べた。これらの細胞にデグロンを機能させるための薬剤を添加し、PD-1 および mCherry の発現が低下しているかどうかを

Western blotting やフローサイトメーター (FCM) を用いて調べた。また、十分に発現が減少したところで薬剤の投与を停止し、その後の PD-1 および mCherry の増加を確認した。

(2) マウス内在性 PD-1-mCherry-デグロンタグ融合タンパク質の挙動確認

- a) 内在性 PD-1 の C 末端側に、蛍光タンパク質 mCherry とデグロンタグ (Dtag) を融合させた PD-1-mCherry-Dtag を発現するホモ接合ノックイン (KI) マウスを作製した。C57BL/6J 背景の ES 細胞に CRISPR/Cas9 を用いて相同組換えによってノックインベクターを導入し、マウス内在性 *Pdcd1* の 3' 末端に mCherry-デグロンタグをノックインした。ES 細胞と ICR の 8 細胞期胚をアグリゲーションすることでキメラマウスを作製した。キメラ雄マウスと C57BL/6J 雌マウスを交配してヘテロ接合マウスを作製し、ヘテロ接合マウス同士を交配してホモ接合 KI マウスを得た。
- b) KI マウスの脾臓由来 T 細胞を *in vitro* で Concanavalin A (ConA) を加えることで刺激し、PD-1 を発現させた。この細胞に薬剤を加えて PD-1 や mCherry の挙動を調べた。
- c) KI マウスに MC-38 大腸がんアデノカルシノーマ細胞を移植後、デグロンシステムを機能させる薬剤を KI マウスに腹腔注射し、がん細胞微小環境における免疫細胞での PD-1 および mCherry の減少量を調べ、最適な投与方法および投与量を確認した。

(3) がん細胞を生体内で排除するシステムの構築

- a) デグロンシステムを導入した T 細胞の *ex vivo* 培養系での細胞傷害活性を測定した。(I) で作製した PD-1-mCherry-Dtag マウスの T 細胞を培養に移し、薬剤によって PD-1 を消失させた時の PD-L1 陽性がん細胞に対する細胞傷害活性を測定した。
- c) KI マウスの骨髄細胞を致死量ガンマ線照射した野生型レシピエントマウスに移植した。コントロールとして、野生型骨髄細胞を移植した野生型マウスを準備した。細胞を移植して生着させた後、MC-38 細胞を移植し、薬剤を投与した場合と投与しない場合とでがん細胞の増殖を比較した。また、薬剤投与群においてがん細胞が排除できたら、細胞傷害性 T 細胞が入れ替わった 2 ヶ月後に同じマウスにもう一度がん細胞を移植し、再び排除することができるかどうかを調べた。また、血清中の自己抗体価の測定や、組織学的解析によって自己免疫疾患発症の有無をモニターした。

4. 研究成果

(1) 培養細胞でのデグロンシステムの機能確認

PD-1-mCherry-デグロンタグ発現ベクターを強制発現させた EL4 細胞や Jurkat 細胞を用いて、デグロンシステムによって、薬剤添加時に培養細胞やマウスで PD-1 を分解できるシステムを確立した。PD-1-mCherry-デグロンタグ発現ベクターを導入した EL4 細胞や Jurkat 細胞では、溶媒を添加したコントロールではデグロンタグが自己消化されることで PD-1-mCherry が安定化し、膜に局在していることを確認した。この細胞に薬剤を添加すると、PD-1-mCherry が 20-33% 程度に減少した。一度薬剤処理した細胞を、再び薬剤を含まない培地に戻すと、PD-1-mCherry の発現が回復した。

(2) マウス内在性 PD-1-mCherry-デグロンタグ融合タンパク質の挙動確認

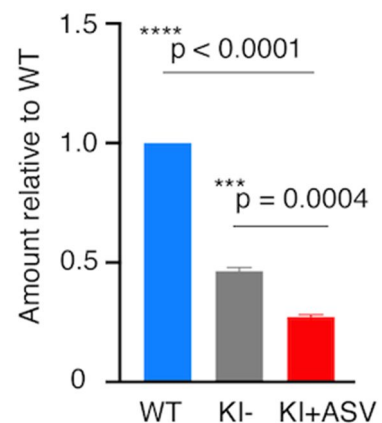


図2 野生型 (WT), 溶媒添加 KI (KI-) および薬剤添加した KI (KI+ASV) 脾臓細胞の PD-1 発現量

KI 脾臓細胞中の PD-1-mCherry は、2-3 日間の ConA 刺激によって増加し、薬剤添加によるデグロンタグ安定化によって減少した(図2)。予想外なことには、溶媒を添加した場合でも、KI 脾臓細胞の PD-1 は野生型と比較すると約 50%に減少してしまっていた。これは、薬剤添加無しでもデグロンタグが完全に自己消化されない、いわゆるリークがあるためと考えられた。

(3) がん細胞を生体内で排除するシステムの構築

KI マウスに接種した MC-38 細胞の成長は、薬剤投与によって、野生型および溶媒添加の KI マウスに比べて抑制された(図3)。さらに、KI の骨髓細胞を移植した野生型マウス(骨髓キメラマウス)に薬剤を投与したところ、MC-38 細胞の増殖も抑制された。よって、KI マウスに薬剤を投与することで MC-38 細胞の増殖が抑制できたのは、血球細胞に薬剤が作用した結果、PD-1 の発現が減少したためと考えられた。

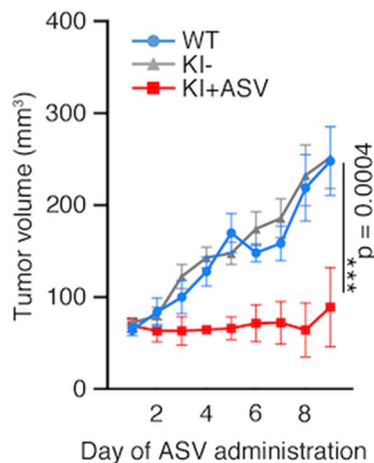


図3 MC-38 細胞を野生型 (WT), ホモ KI マウス (KI) に移植した後, KI には薬剤 (KI+ASV) または溶媒 (KI-) を腹腔投与した。MC-38 細胞は KI+ASV においてのみ増殖が抑制された。

本研究は、マウスの内在性タンパク質にデグロンタグを使用した初めての研究であり、デグロンシステムは、マウス個体における生物学的研究に用いることができると考えられる。さらに、本研究で使用したデグロンシステムを機能させるための薬剤は、既に臨床に用いられていることから、将来的に、遺伝子操作を施した血球細胞などの移植による病気の治療にも応用することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Chie Naruse, Kazushi Sugihara, Fumihiro Sugiyama and 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 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総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

実験動物学分野研究室 http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html

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	成瀬 智恵 (Naruse Chie) (30372486)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	杉原 一司 (Sugihara Kazushi) (10377418)	京都大学・医学研究科・技術専門職員 (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