

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22808

研究課題名(和文) CRISPR/dCas9-TET1系を用いた転移因子のがん細胞における機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of transposable elements after CRISPR/dCas9-TET1 system in cancer cells

研究代表者

大谷 仁志(Ohtani, Hitoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：10627087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA脱メチル化剤である5-アザシチジンは、血液腫瘍治療薬であるが、その作用機序は完全には解明されていない。近年の研究から、内在性レトロウイルスを含む転移因子の関与が示唆されている。本研究では、サイト特異的にDNA脱メチル化を促すエピゲノム編集技術を用いてLTR12Cの機能解明に挑んだ。抗がん作用を調査したところ、有意な差は検出されなかった。今後、その他の転移因子の機能を調査する必要がある。また、LTR12Cは機能未知であるため、その解明に挑んだ。LTR12Cによる宿主ヒト遺伝子の発現制御は、LTR12C配列だけでなく、その周辺領域によっても調節されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA脱メチル化剤である5-アザシチジンは、血液腫瘍治療の第一選択薬であるが、その作用機序は完全には解明されていない。近年の研究から内在性レトロウイルスを含む転移因子の関与が示唆されていた。本研究では、CRISPR activationを用いて内在性レトロウイルスLTR12Cの機能解明に挑んだ。LTR12Cは宿主であるヒトの遺伝子を直接的に制御する機能を持つことが明らかとなった。今後、その他の転移因子の機能も調査する予定である。これらの研究は、5-アザシチジンの抗がんとして作用機序を解明し、より効果的ながん治療法の開発へと繋げるものである。

研究成果の概要(英文)：5-azacitidine, a DNA demethylating agent, is an epigenetic drug for the treatment of hematological malignancies. However, its mechanism of action has not been completely elucidated. Recent studies suggest functional involvements of transposable elements, including endogenous retroviruses, in the mechanism. In this study, we tried to elucidate the function of LTR12C using epigenome editing technology that promotes DNA demethylation in a site-specific manner. The anticancer effect of 5-azacitidine was not observed after over expression of LTR12C. In the future, it is necessary to investigate the functions of other type of transposable elements. On the other hand, since the function of LTR12C is unknown, we tried to clarify it. The induction of host human gene expression by LTR12C is regulated not only by the LTR12C sequence but also by the surrounding region.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：転移因子 がん治療 CRISPR activation 内在性レトロウイルス 転写調節領域

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化阻害剤である 5-アザシチジンは、血液腫瘍に対する抗がん剤として用いられているが、その抗腫瘍効果はおよそ半数の患者に限られており、作用機序も完全には解明されていない。近年、我々を含む複数のグループが、DNA 脱メチル化により発現が促された転位因子の一種である内在性レトロウイルス (ERVs) が、5-アザシチジンの作用機序において重要な役割を担っていることを報告した (Roulois et al., *Cell*. 2015 など)。ERVs 由来の RNA が、宿主の自然免疫系を活性化し、がん細胞にアポトーシスを誘導すると考えられている。この先攻研究に限らず、ERVs を含む転移因子の RNA が、外来性レトロウイルスの RNA と同様に、宿主の自然免疫系に認識されるであろうことは古くから議論されてきたが (Abraham et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990)、未だ十分な証拠は得られておらず多くの疑問を残している。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、自然免疫系活性化のトリガーとしての、ERVs を含む転移因子の潜在的役割を明らかにし、がん治療戦略に新たな知見を加えることとした。正常細胞における転移因子の異常な発現上昇が、ゲノムの不安定化に繋がることや、自己免疫疾患のリスクとなると考えられていることから、長らく転移因子はヒトに害を及ぼすもの “Enemy within” だと捉えられてきた (Kassiotis et al., *Nat Rev Immunol.* 2016)。しかしながら、申請者らはこれまでに、転移因子の活性化が 5-アザシチジンの抗がん剤としての作用機序の一端を担っているという、ヒトにとって有益な新しい機能の存在を示唆してきた。従って、がん細胞特異的に特定の転移因子の発現を誘導することができれば、より効率的でリスクの低いがん治療法の開発に繋がると期待される。そこで本研究課題では、近年報告された、特定のゲノム領域に DNA 脱メチル化を促す酵素 (TET1) をリクルートすることで、サイト特異的に DNA メチル化状態を操作する技術である CRISPR/dCas9-TET1 system を用いて、特定の転移因子ファミリーの発現を誘導することに挑んだ。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と 5-アザシチジン投与

ヒト胚性腎臓培養細胞 (HEK293T) に PBS (コントロール) もしくは 300nM の 5-アザシチジンを投与した後、細胞を 5 日後に採取。ヒト結腸腺癌培養細胞 (HCT116), ヒト乳癌培養細胞 (MCF7), およびヒト卵巣癌培養細胞 (A2780) に関するデータは、先行研究より入手 (Ohtani et al. 2018)。

(2) プラスミドの構築とトランスフェクション

pPlatTET-gRNA2 (Addgene #82559) を CRISPR/dCas9-SunTag-TET1 システムおよび CRISPR/dCas9-SunTag-VP64 システムのソースとした。VP64 配列は pcDNA-dCas9-VP64 plasmid (Addgene #47107) を基に PCR により増幅した。LTR12C をターゲットとしたガイド RNA (gRNA) は、RepeatMasker を基に LTR12C ファミリーのコンセンサス配列にデザインした。フラグメントは Gibson assembly により連結した。HEK293T 細胞へのトランスフェクションは、Lipofectamine LTX Reagent (Termo Fisher Scientific) および 500ng プラスミドを用いて行った。

(3) RNA-seq

5-アザシチジンを投与した後、および CRISPRa 後の Total RNA は Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) により精製。cDNA ライブラリーは RNA HyperPrep Kits with RiboErase (KAPA Biosystems) により作成。RNA-seq は NextSeq 500 instrument (Illumina) を用いて single-end 75 bases の条件で行った。human GRCh37/hg19 reference genome へのマッピングは HISAT2 により行い (Kim et al. 2013)、内在性レトロウイルスを含む転移因子へのアノテーションは RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) を用いた。

(4) RT-qPCR

cDNA の合成は iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) を用い、qPCR は CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) により行った。

(5) ChIP-seq

トランスフェクション後の細胞を用いた ChIP-seq は先行研究の手法に基づいて行った (Ohtani et al. 2018)。以下に簡潔に記す。細胞を 1% formaldehyde 10min によりクロスリンクさせた後、1% lysis buffer (50 mM HEPES-KOH at pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitors) により懸濁。およそ 300 base pairs にシェアリングした後、HA-tag antibody (Cell Signaling, C29F4), anti-H3K4me3 antibody (Diagenode, C42D8), もしくは anti-H3K27ac antibody (Active Motif, MABI 0309) を用いて免疫沈降を行った。シークエンスライブラリーは TruSeq ChIP Library Prep

Kit (Illumina)により作成し、ChIP-seqはNextSeq 500 instrument (Illumina)を用いて single-end 75 bases の条件で行った。human GRCh37/hg19 reference genome へのマッピングはBowtie2により行い、転移因子へのアノテーションはRepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>)を用いた。

4. 研究成果

(1) LTR12Cは5-アザシチジン投与後に最も強い発現上昇を示す

転移因子を対象とした近年のゲノムワイドな解析により、内在性レトロウイルスの一種であるLTR12Cが、5-アザシチジンの投与後のがん細胞において最も強い発現上昇を示す転移因子であることが報告されている(Ohtani et al. 2018)。その結果を確かめるため、ヒト結腸腺癌培養細胞(HCT116)、ヒト乳癌培養細胞(MCF7)、ヒト卵巣癌培養細胞(A2780)、およびヒト胚性腎臓培養細胞(HEK293T)を対象とし、5-アザシチジン投与後の内在性レトロウイルスの発現レベルを調査した。転移因子のデータベースに登録されている内在性レトロウイルスのファミリーは、およそ400種にのぼるが、いずれの細胞種においてもLTR12Cが最も強い発現上昇を示す内在性レトロウイルスファミリーとして検出された(図1)。この結果を踏まえ、LTR12Cを自然免疫機構活性化のトリガーとしての第一候補とした

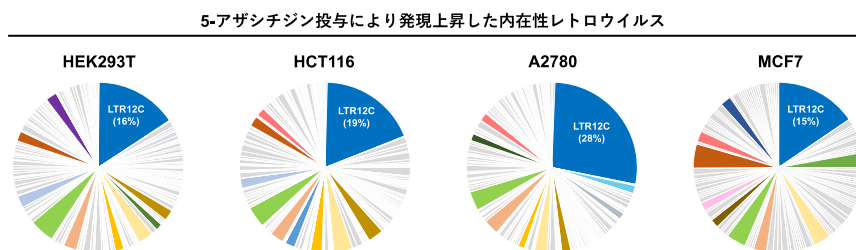


図1: 5-アザシチジン投与後の培養細胞における内在性レトロウイルス
PBS投与後と比較し、5-アザシチジン投与後に2倍以上発現上昇していた内在性レトロウイルスのコピーを、ファミリー毎に分類し表示。Top10をカラーで示す。

(2) LTR12Cは自然免疫機構活性化のトリガーとはならない

複数コピーのLTR12Cを同時にターゲットできるようにgRNAをLTR12Cの進化的に保存された領域に設計した。CRISPR/dCas9-SunTag-TET1システムを用いて、LTR12Cの発現誘導を試みたが、十分な発現量が得られなかった(図2A, B)。そこで、CRISPR/dCas9-SunTag-VP64システムによるLTR12Cの発現誘導に挑んだ(図2A, B)。CRISPR/dCas9-SunTag-VP64システムを用いた場合のみ強い発現上昇が認められたため、当システムを以下の実験に用いた。LTR12Cが自然免疫機構活性化のトリガーとなり得るのかを調査するため、CRISPRa後のHCT116における自然免疫系遺伝子の発現レベルをRT-qPCRにより測定した。解析の結果、有意な発現上昇は認められなかった(図2C)。従って、5-アザシチジンの投与後に観察される自然免疫系の活性化は、LTR12Cに依存しないものと考えられる。SINEやLINEなど内在性レトロウイルス以外の転移因子も自然免疫機構活性化のトリガーとなるとの報告があるため(Jones et al. 2019)、今後それらを対象としたCRISPRaに挑むことが求められる。

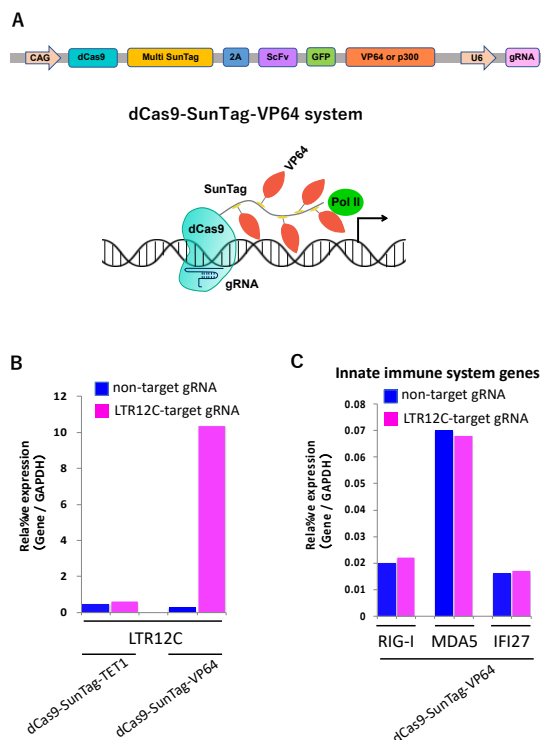


図2: CRISPR/dCas9-SunTag-VP64システムによるLTR12Cの発現誘導
A. dCas9-SunTag-VP64のモデル図。2A self-cleaving peptide (2A); Single-chain variable fragment (ScFv) B. dCas9-SunTag-TET1、およびdCas9-SunTag-VP64システムによるLTR12Cの発現誘導をRT-qPCRで示す。C. dCas9-SunTag-VP64システムによるLTR12Cの発現誘導後の自然免疫系遺伝子(RIG-I, MDA5, IFI27)の発現レベルをRT-qPCRで示す。

(3) CRISPR/dCas9-Suntag-VP64 による off-target 効果は限定的

LTR12C の CRISPRa による自然免疫機構の活性化は認められなかったが、複数の LTR12C のコピーを同時に活性化させた報告はこれまでにないため、LTR12C の未知の機能の解明に挑んだ。先行研究より、CRISPRa システムによる off-target 効果の危険性が示されていたため (Kuscu et al. 2014)、まず CRISPR/dCas9-Suntag-VP64 の off-target 効果の評価した。Hemagglutinin tagged dCas9 (dCas9-HA) を用いた ChIP-seq を行ったところ、その結合サイトの大部分 (99%) は LTR12C エlement 上に位置していた (図 3)。残りの 1% は LTR12C と非常に相溶性の高い LTR12E 上に位置しており、gRNA がデザインされたサイトに関しては 100% の相溶性を示した。従って、本研究において、CRISPRa システムがもたらす off-target 効果は限定的であった。

dCas9 に結合している内在性レトロウイルス
(n = 503)

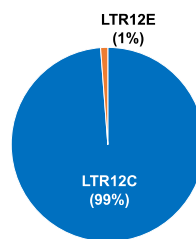


図3: CRISPR/dCas9-SunTag-VP64 システムによる LTR12C の発現誘導後の off-target 効果の検証

HEK293T 細胞における LTR12C をターゲットとした CRISPRa 後に dCas9 と結合した内在性レトロウイルスのファミリー。

(4) プロモーター活性を示す LTR12C は一部の Element に限られる

内在性レトロウイルスは、プロモーターやエンハンサーなどの転写調節領域として、宿主であるヒト遺伝子の発現を直接的に制御する機能を持つ Element として知られている (Ohtani and Iwasaki 2021)。そこで、プロモーター領域のマーカーとして用いられているヒストン修飾である H3K4me3、およびエンハンサーのマーカーである H3K27ac の蓄積を ChIP-seq を基に調査した。興味深いことに、大半の活性化された LTR12C には H3K27ac の蓄積が認められたことに対して、H3K4me3 の蓄積は 20% ほどの LTR12C に限定されていた (図 4)。従って、LTR12C は、プロモーター/エンハンサー活性を持つ Element とエンハンサー活性のみを持つ Element の 2 群に分けることができる。

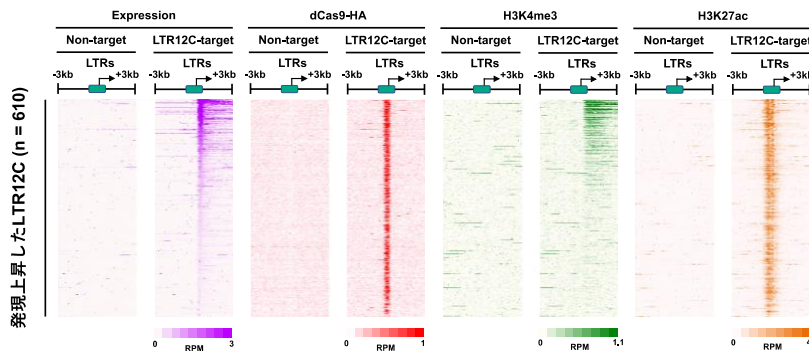


図4: CRISPR/dCas9-SunTag-VP64 システムによる LTR12C の発現誘導後のエピジェネティックな修飾の変化

ヒートマップは LTR12C をターゲットとした CRISPRa 後の HEK293T 細胞における LTR12C の発現量、dCas9 結合、H3K4me3 (プロモーターマーカー)、および H3K27ac (エンハンサーマーカー) の Reads per million reads (RPM) を表す。

(5) プロモーター/エンハンサー活性を持つ LTR12C は下流のヒト遺伝子を活性化する

そこで、これら 2 群の LTR12C が、転写調節領域としてどのように下流のヒト遺伝子の発現を制御しているのかを調査した。エンハンサー活性のみを持つ LTR12C は、下流の発現レベルに大きな影響を与えていなかったことに対し、プロモーター/エンハンサー活性を持つ LTR12C は、大きな発現の変化を誘導していた。従って、下流にヒト遺伝子が位置している場合、その発現は強く誘導されることになる。このように、一部の LTR12C Element のみがプロモーター/エンハンサー活性を持つ機構の詳細は明らかになっていないが、LTR12C の近傍に位置するその他の転移因子由来の領域等が潜在的にプロモーターを有しているのかもしれない。今後さらなる解析が求められる。

<引用文献>

Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, Rangarajan S, Shivalila CS, Dadon DB, Jaenisch R. 2013. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* **23**: 1163-1171.

Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, Hein A, Rote NS, Cope LM, Snyder A, et al. 2017. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **169**: 361.

- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, et al. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* **10**: 223-232.
- Hilton IB, D' Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. 2015. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* **33**: 510-517.
- Jones PA, Ohtani H, Chakravarthy A, De Carvalho DD. 2019. Epigenetic therapy in immunoncology. *Nat Rev Cancer* **19**: 151-161.
- Kassiotis G, Stoye JP. 2016. Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat Rev Immunol* **16**: 207-219.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**: R36.
- Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M. 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* **32**: 677-683.
- Liu M, Ohtani H, Zhou W, Ørskov AD, Charlet J, Zhang YW, Shen H, Baylin SB, Liang G, Grønabæk K, et al. 2016. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 10238-10244.
- Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, et al. 2016. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* **34**: 1060-1065.
- Ohtani H, Iwasaki YW. 2021. Rewiring of chromatin state and gene expression by transposable elements. *Dev Growth Differ* **63**: 262-273.
- Ohtani H, Liu M, Zhou W, Liang G, Jones PA. 2018. Switching roles for DNA and histone methylation depend on evolutionary ages of human endogenous retroviruses. *Genome Res* **28**: 1147-1157.
- Ohtani H, Ørskov AD, Helbo AS, Gillberg L, Liu M, Zhou W, Ungerstedt J, Hellström-Lindberg E, Sun W, Liang G, et al. 2020. Activation of a Subset of Evolutionarily Young Transposable Elements and Innate Immunity Are Linked to Clinical Responses to 5-Azacitidine. *Cancer Res* **80**: 2441-2450.
- Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, Han H, Liang G, Jones PA, Pugh TJ, et al. 2015. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell* **162**: 961-973.
- Treppendahl MB, Kristensen LS, Grønabæk K. 2014. Predicting response to epigenetic therapy. *J Clin Invest* **124**: 47-55.
- You JS, Jones PA. 2012. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin. *Cancer Cell* **22**: 9-20.

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 Ohtani Hitoshi, Iwasaki Yuka W. | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Rewiring of chromatin state and gene expression by transposable elements | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation | 6. 最初と最後の頁 262 ~ 273 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12735 | 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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 大谷仁志 |
| 2. 発表標題 レトロトランスポソンの活性化が抗がん剤の作用機序の一端を担う |
| 3. 学会等名 第92回日本遺伝学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大谷仁志 |
| 2. 発表標題 レトロトランスポソンのDNA 脱メチル化が癌細胞の増殖を抑制する |
| 3. 学会等名 第93回日本遺伝学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|