

令和 6 年 6 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：2021～2023

課題番号：21K19188

研究課題名（和文）時期および組織特異的なプロテインノックダウンを可能とするデグロンシステムの開発

研究課題名（英文）Protein knockdown system using IMiDs in mice.

研究代表者

成瀬 智恵（Naruse, Chie）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30372486

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）：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、時期および組織・細胞特異的にプロテインノックダウンを可能とする実験系を開発するのが本研究の目的である。EGFPにIox66および反対向きのIox71で挟まれた逆向きのIKZFタグをつなぎ、Creを発現させたところ、Creを発現させることで約80%の細胞においてタグの反転が起きた。また、POMまたはIBRを加えて、EGFP量を解析したところ、反転したタグは機能的であり、EGFPが減少することがわかった。最終的には、SDタグを用いた場合、リークが20%程度に抑制され、発現量低下率も10%以下と非常に良いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの神経研究のための実験動物は遺伝子ノックアウトによるものが多く、タンパク質の欠損は不可逆的であった。また、一過性に遺伝子発現を制御するTetシステムは、Doxなどの薬剤が脳血液関門を通過しないため脳の一部領域に直接投与する以外には使用できなかった。そこで、薬剤を腹腔内投与することによって、脳神経系組織全体において標的タンパク質を簡便にかつ迅速にノックダウンできるシステムを開発すれば、脳神経研究に役立てられる。さらに、この方法を拡張して、組織・細胞特異的にデグロンシステムを機能させることができれば、脳神経研究だけでなく、様々な分野の研究に応用が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We are currently aiming to develop a simple protein knockdown method using thalidomide analogs. Since thalidomide analogs have been considered to have no neoligand degrading activity in mouse cells, we generated CRBN humanized mice by genome editing and evaluated the protein knockdown efficiency by measuring the fluorescence intensity of EGFP-degglutination tag derivatives. CRBN humanized mice developed normally and had no reproductive problems. The fluorescence intensity of the EGFP-degglutag fusion was measured in cells harvested from living animals. We also found that protein knockdown of the neoligand occurred even in wild-type mouse cells. Experiments using several cultured cell lines suggested that the activity was higher in undifferentiated cell lines. We also applied this protein knockdown system to endogenous PD-1 in vivo in mice. We succeeded in suppressing the expression of PD-1 in T cells and the growth of cancer cell lines transplanted into mice.

研究分野：実験動物学

キーワード：マウス デグロン プロテインノックダウン

### 1. 研究開始当初の背景

デグロンシステムは、細胞が本来持つタンパク質分解システムを利用して、人工的にデグロンタグを付加した標的タンパク質を、薬剤の添加により分解するプロテインノックダウン法である (図1: Chung et al. Nat Chem Bio. 2015)。本方法は、遺伝子組換え技術を用いて標的タンパク質にデグロンタグを付加するので、どのような細胞内タンパク質にも適用が可能と考えられる。また、これまでにタンパク質の発現制御法として用いられてきた、遺伝子ノックアウト、mRNA 転写発現制御など、他の方法と比較して、可逆的であり、反応が迅速であることに大きな利点がある。基礎研究においては、AID システムや SMASh デグロンなど、様々なデグロンシステムが世界的に開発され、培養細胞での研究に広く用いられている (Nat Methods 2009, Gene Dev 2019 など)。動物個体での利用については、株化がん細胞にデグロンシステムを強制発現させてマウスに移植した例 (PNAS, 2018) が報告されているが、個体の内在性タンパク質に応用した例は未だ発表がない。しかしながら、現在世界的に開発が進められており、将来的に広く使用される技術になると考えられる。

これまでの神経研究のための実験動物は遺伝子ノックアウトによるものが多く、タンパク質の欠損は不可逆的であった。また、一過性に遺伝子発現を制御する Tet システムは、Dox などの薬剤が脳血液関門を通過しないため脳の一部領域に直接投与する以外には使用できなかった。そこで、薬剤を腹腔内投与することによって、脳神経系組織全体において標的タンパク質を簡便にかつ迅速にノックダウンできるシステムを開発すれば、脳神経研究に役立てられるのではないかと考えた。さらに、この方法を拡張して、組織・細胞特異的にデグロンシステムを機能させることができれば、脳神経研究だけでなく、様々な分野の研究に応用が可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

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、時期および組織・細胞特異的にプロテインノックダウンを可能とする実験系を開発するのが目的である。

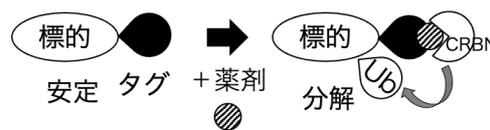
これまでに我々は、NS3/4A プロテアーゼを利用した SMASh デグロンシステムを用いて、培養細胞やマウスで PD-1 を時間特異的に分解できるシステムを確立した (成瀬ら, 投稿準備中, 挑戦的研究 (萌芽) 2018-2020 年度: 代表浅野, 基盤(B)2020-2023 年度: 代表成瀬による成果)。PD-1-mCherry-SMASh ノックイン (KI) マウスに MC-38 アデノカルシノーマ細胞を移植したのち、NS3/4A プロテアーゼ阻害薬であるアスナプレビル (ASV) を投与すると、ASV を投与した野生型および無処置の KI マウスに比べて MC-38 の増殖が抑制された。このように、デグロンシステムを生体内で利用することは、様々な生物学的研究のみならず、病気の治療にもつながることが期待される。

しかしながら、SMASh デグロンで使用した試薬は脳血液関門を通過しないため、脳に直接試薬を投与しないと脳研究に使用することができない。そこで、脳神経細胞でも簡便にプロテインノックダウンができるような系を確立するため、脳血液関門を通過するポマリドミドを用いたデグロンシステムを生体に導入することを考えた。さらに、組織・細胞特異的なノックダウンが実現できれば、さらに使用方法を拡張できると考え、本研究では、脳神経細胞特異的なノックダウンを目指そうと考えた。

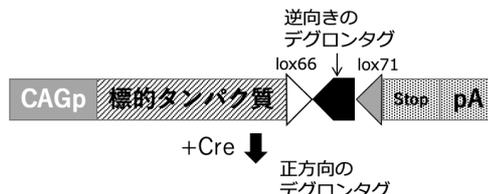
### 3. 研究の方法

(1) 脳血液関門を通過するポマリドミドによって標的タンパク質が分解される IKZF デグロンシステム (PNAS 2018, Comm Biol 2020) を生体に導入する。ユビキチンに含まれる CRBN は、ヒトではポマリドミド存在下でデグロンタグと強く結合するが、マウスではデグロンタグとの結合が弱いため、ヒト型点変異 (I391V) を導入して結合できるようにした細胞・マウスを用いた。ゲノム編集により、マウス CRBN に変異を導入し、ヒト型 CRBN を持つマウス ES 細胞を作製して in vitro 実験に用いた。また、マウス個体での実験には、ヒト型 CRBN をホモに持つ個体を用いた。

(2) EGFP-reverse tag を発現するベクターをヒト培養細胞株 (HeLa) に導入し、Cre によるデグ



本研究で用いるデグロンシステム: IKAF3 や Sal14 の ZF ドメイン (タグ) を付加した標的タンパク質は、ポマリドミドなどの薬剤存在下にユビキチンリガーゼに含まれるセレブロン (CRBN) と結合し、ユビキチン化されて、プロテアソームで分解される



細胞に導入する遺伝子の構造

lox66 と lox71 で囲まれたデグロンタグは Cre によって反転し正方向になって初めて機能する。反転した結果生じる loxP と lox72 では組換えが起こらないため、正方向のタグは安定である。

\* 標的タンパク質-正方向デグロンタグがインフレームになるよう設計する。

ロンタグの反転効率と、ポマリドミドやイベルドミドなどの IMiDs/CELMoDs を加えた時のタンパク質分解について調べた。

(3) (2)の予備検討の際、IKZF デグロンタグのリークが大きく、分解効率も低いことがわかったため、リークが少なく分解効率のよいタグを探索した。また、リンカー配列、N 末または C 末にタグがある時の効果の違いや、細胞種についても検討を行った。

(4) マウス野生型細胞でのポマリドミドなど IMiDs/CELMoDs の効果を *in vitro* で行った。また、CRBN 野生型マウスにおける、PD-1-デグロンタグ融合体に対する、薬剤の効果の検討を行った。

#### 4. 研究成果

本研究の最終的な目的として考えていた HP1 $\gamma$  のノックダウンを行うための予備検討として、標的の N 末端への IKZF タグの付加を試みた。EGFP に lox66 および反対向きの lox71 で挟まれた逆向きの IKZF タグをつないだ遺伝子を HeLa 細胞で発現させ、Cre を発現させたところ、Cre を発現させることで約 80%の細胞においてタグの反転が起きた。また、POM または IBR を加えて、EGFP 量を解析したところ、反転したタグは機能的であり、EGFP が減少することがわかった。しかしながら、N 末にタグを付加した場合、リークが起り、50%程度に低下することがわかった。また、IBR を加えた場合の発現低下率は約 30%であったことから、リーク、発現量低下共に十分とは言えず、もっと良いタグを探索する必要があった。

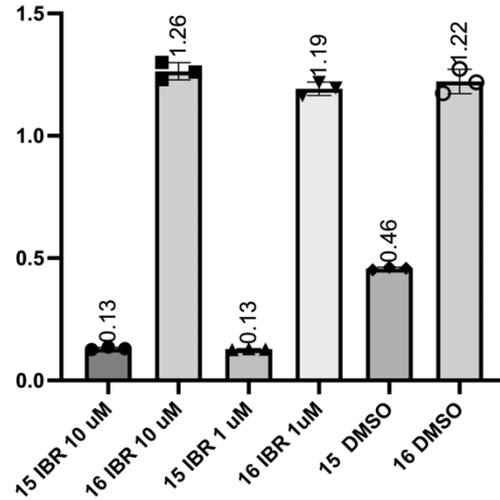
そこで、IKZF と ZFP の融合タンパク質である super degron tag (SD) を試した結果、リークが 20%程度に抑制され、発現量低下率も 10%以下と非常に良いことがわかった。

これまで、サリドマイド誘導体は、マウス細胞においては IKZF タグを含むネオリガンド分解活性を持たないと考えられてきたため、我々は CRBN をヒト化したマウスをゲノム編集により作製し、EGFP-デグロンタグ誘導体の蛍光強度を測定することでプロテインノックダウン効率を評価した。CRBN ヒト

化マウスは正常に発生し、生殖にも問題がなかった。生体より細胞を採取して EGFP-デグロンタグ融合体の蛍光強度を測定したところ、CRBN ヒト化マウス細胞においては、サリドマイドアナログ添加によって 10%以下までノックダウンすることが可能であった。また、野生型マウス細胞においてもネオリガンドのプロテインノックダウンが起こることを見出した。

野生型マウス ES 細胞およびヒト ES 細胞における分解効率を調べた結果、ヒト ES 細胞における分解効率がマウスに比べて 10 倍高いことがわかった。また、マウスとヒトでの分解能の相違はタンパク質分解に関わる酵素である CRBN の 1 アミノ酸の違いであると考えられているが、マウス特有の分解能力高さに起因することも考えられたので、CRBN がマウスと同じタイプである、ラット ES 細胞についても同様に調べたところ、マウスと同様であったことから、CRBN のタイプに依存することが明らかになった。また、分化した細胞の代表として、T 細胞リンパ腫由来の Jurkat (ヒト) と EL4 (マウス)、また、HEK293 (ヒト) と NIH3T3 (マウス) での EGFP-デグロンタグ融合タンパク質の分解を比較した結果、いずれもヒト細胞での分解効率がマウス細胞の 10 倍程度高かった。ES 細胞と他の細胞とで比較した結果、ヒト ES 細胞では他の細胞腫と比較して、2 倍程度効率が高かったが、マウス ES 細胞では 2 倍程度低かった。よって、ヒト ES 細胞では、マウス ES 細胞と比較して CRBN の構造以外にもタンパク質分解効率が高くなる素因があることが示唆された。内在性 Oct4 や複製開始因子遺伝子等へデグロンタグの導入を試みたが、Oct4 への導入はマウス ES 細胞、ヒト ES 細胞共に困難であり、今後、遺伝子導入効率を向上させる方法を調べたいと考えている。

また、生体での使用方法の一例として、このタンパク質ノックダウンシステムをマウス生体における内在性 PD-1 に適用した。内在性 PD-1 遺伝子の下流に、ゲノム編集によって SD を挿入したマウスを作製し、活性化した脾臓 T 細胞において、イベルドミドの添加によって PD-1 がほぼ消失することを確認した。このマウスの造血幹細胞を致死量放射線照射した野生型マウスに移植し、MC-38 がん細胞株を移植したのち、イベルドミドを経口投与すると、野生型マウスの造血幹細胞を移植した群、投薬しなかった群と比較して、がん細胞株の増殖が抑制されることがわかった。以上のことから、*in vitro*、*in vivo* 両方において、内在性 PD-1 タンパク質をノックダウンできる実験系ができたと考えられる。現在のところ、マウス生体において、組織特異的なノックダウンを実現するには至っていないが、本研究により生体での使用が可能であることが明らかになった SD タグおよびイベルドミド経口投与によるノックダウンシステムを適用することで、組織特異的なノックダウンのできる実験系を構築する予定である。



Reverse tag-EGFP に Cre を加えてタグを正方向にすると (#15)、Cre を加えない場合 (#16) と比較して、IBR を加えない時でも発現が約半分に低下した。また、IBR を加えた場合の発現低下率は約 30%であった。

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 1件）

1. 著者名 Naruse C, Sugihara K, Miyazaki T, Pan X, Sugiyama F, Asano M.	4. 巻 4
2. 論文標題 A degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of tumor cells in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/narcan/zcac019	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 成瀬智恵, 杉原一司, パンシュチ, 宮崎龍彦, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 内在性PD-1へのデグロンタグ組込みによるマウス生体におけるがん細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第69回実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成瀬智恵, 杉原一司, パンシュチ, 宮崎龍彦, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 The SMASH degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of MC-38 tumor cells in mice.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成瀬智恵, 石橋旺士郎, 大串雅俊, 西内巧, 今井宏彦, 松崎朋子, Pan Xuchi, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 サリドマイド誘導体依存的なPD-1ノックダウンによりがん増殖が抑制される
3. 学会等名 第71回実験動物学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 成瀬智恵, 石橋旺士郎, 松崎朋子, パンシュチ, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 サリドマイドアナログを使用したノックダウンのマウスにおける実用化
3. 学会等名 第70回実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成瀬智恵, 石橋旺士郎, 松崎朋子, パンシュチ, 杉山文博, 浅野雅秀
2. 発表標題 サリドマイドアナログを使用したノックダウンのマウスにおける実用化
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chie Naruse, Kazushi Sugihara, Xuchi Pan, Tatsuhiko Miyazaki, Fumihiro Sugiyama, Masahide Asano
2. 発表標題 The SMASH degron system targeting endogenous PD-1 inhibits the growth of MC-38 tumor cells in mice.
3. 学会等名 IMGC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>必要な時だけ標的タンパク質を壊すがん治療 薬剤投与によるマウス内在性PD-1の分解  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-06-20-0">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-06-20-0</a></p>
---

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	浅野 雅秀  (Asano Masahide)  (50251450)	京都大学・医学研究科・教授    (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