

■受領No.1405

## CRISPR/Cas9 技術を応用した皮膚癌における 新規エピゲノム編集の開発

代表研究者

應田 涼太

北海道大学大学院医学研究院 助教



## Development of new epigenome editing in skin cancer using CRISPR / Cas9 technology

Principal Researcher

Ouda Ryota,

Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University Assistant professor

MHC-I 経路における抗原提示は癌細胞やウイルス感染細胞の除去に重要である。我々は MHC-I 経路に関わっている遺伝子の発現を制御する主要転写因子として NLRC5 を同定した。更に、癌細胞において DNA メチル化によって NLRC5 の発現が低下し免疫逃避の一因となっている事を見出した。実際、NLRC5 の発現レベルやメチル化度は各種癌において 5 年生存率に大きく関わっていることが我々の研究によって明らかとなった。以上のことから、NLRC5 遺伝子を標的とし、CRISPR/Cas9 システムを応用した新しい特異的脱メチル化技術の開発を行った。

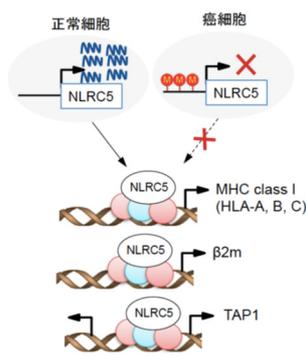
Antigen presentation in the MHC-I pathway is important for the elimination of cancer cells and virus-infected cells. We have identified NLRC5 as a major transcription factor that regulates the expression of genes involved in the MHC-I pathway. Furthermore, it was found that DNA methylation in cancer cells reduced the expression of NLRC5 and contributed to immune escape. In fact, our study revealed that the expression level and degree of methylation of NLRC5 are significantly related to the 5-year survival rate in various cancers. Based on the above, we have developed a new specific demethylation technique targeting the NLRC5 gene by CRISPR / Cas9 system.

### 1. 研究内容

免疫チェックポイント阻害剤の登場は、癌治療に大きなインパクトを与えて来ている。従来の治療法では全く無効であった進行癌にも、著明な治療効果を示す例も多々報告されている。しかしながら、未だ、こうした癌免疫療法に反応する癌患者は少数派であり、多くの癌患者では治療効果が認められない。多くの原因が考えられるが、一つは現在の癌免疫療法が、免疫系をいかに賦活化させるかに重きを置いており、その相手方である癌

がいかに免疫系から逃れているかに対応出来ていないことが原因である。これまで我々の研究から、癌組織においては NLRC5 遺伝子プロモーターのメチル化が高頻度に起きており、MHC class I 抗原提示経路が機能不全となることにより、癌が免疫機構から逃避することが示された(図1)。更に、悪性黒色腫患者の 5 年生存率と NLRC5 遺伝子発現量が相関し、NLRC5 遺伝子のメチル化度と逆相関することが明らかとなった。以上のことから、NLRC5 遺伝子脱メチル化による癌免疫逃避の阻

害が新たな癌治療戦略において有用であると考えるに至った。しかし、既存の脱メチル化剤は非特異的であるため強い副作用を有し、一部の癌にしか用いることができない。そこで NLRC5 を標的遺伝子として、マウス悪性黒色腫細胞株(B16F10)にて CRISPR/Cas9 システムを応用した遺伝子特異的脱メチル化技術開発を行った。

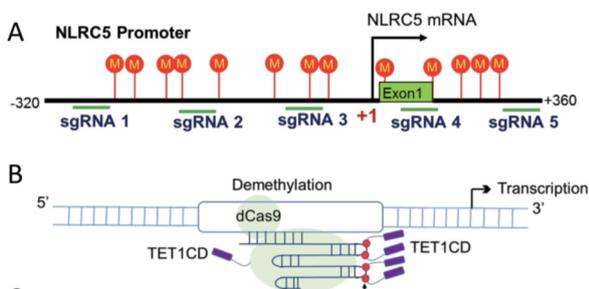


**(図1) NLRC5 を標的とした癌免疫逃避機構**

癌細胞ではNLRC5プロモーター領域のメチル化が高頻度で見られ、その結果MHC-I遺伝子発現も抑制されている。

### 1.1 NLRC5 遺伝子を標的とする脱メチル化システムの構築

我々は CRISPR/Cas9 技術を改変することにより、遺伝子選択的に脱メチル化酵素を標的部位へ送り込むことを目指した。具体的には、①酵素活性を欠損させた Cas9 (dCas9) と脱メチル化酵素 TET1 を融合させた発現ベクター (dCas9-TET1) ②遺伝子特異的なガイド RNA 発現ベクター (sgRNA) ③sgRNA 特異的に結合するバクテリオファージ由来 MS2 coat protein と脱メチル化酵素 TET1 を融合させた発現ベクター (MS2-TET1) を作製した (図2)。



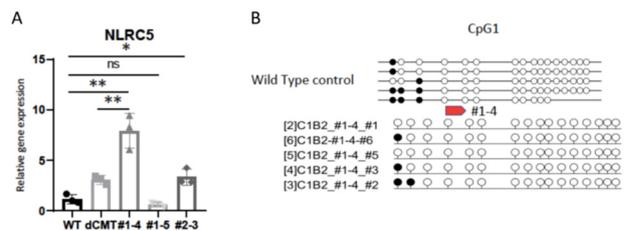
**(図2) CRISPR/Cas9 を応用した NLRC5 脱メチル化技術**

(A) NLRC5 メチル化部位に結合するように設計したガイド RNA (sgRNA)。

(B) dCas9 と脱メチル化酵素 (TET1CD) がガイド RNA によってメチル化部位に結合する模式図。

### 1.2 *In vitro* における NLRC5 遺伝子脱メチル化の確認

上記の脱メチル化誘導発現ベクターを用いて NLRC5 の発現量を qPCR によって測定し、脱メチル化割合はバイサルファイトシーケンス法によって検討を行った。複数の発現ベクターを細胞内に導入するのは非効率であると考えられることから、dCas9-TET1 と MS2-TET1 を Stable に発現する細胞をレンチウイルスによって作成した。そこへ NLRC5 遺伝子を標的とする gRNA をレンチウイルスによって導入し、NLRC5 遺伝子脱メチル化を試みた。その結果、gRNA (#1-4) を導入することによって NLRC5 発現量の上昇が見られ、NLRC5 遺伝子プロモーター上に存在するメチル化領域 (CpG1) において、脱メチル化が確認された (図3)。



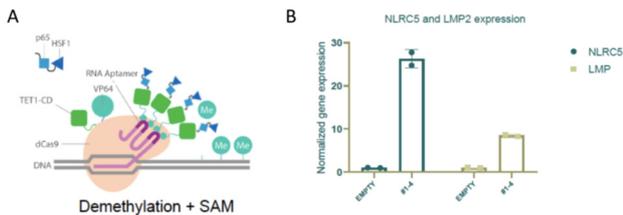
**(図3) NLRC5 遺伝子標的とした gRNA による NLRC5 発現量と脱メチル化の確認**

dCas9 stable B16F10 細胞に設計した NLRC5 標的 gRNA を導入し (A) qPCR によって NLRC5 の発現量 (B) バィサルファイトシーケンス法によって脱メチル化を測定した。●: メチル化部位。

### 1.3 NLRC5 遺伝子脱メチル化技術の改良

上記のように脱メチル化酵素 (TET1) を gRNA によって NLRC5 遺伝子上へ送り込み、発現量の上昇と脱メチル化が観察された。しかし、NLRC5 遺伝子発現量の増加が見られたにも関わらず、MHC-I 遺伝子の発現量に差が観られなかったことから NLRC5 発現誘導が不十分であると考えられる。そこで、dCas9 技術を改変し、更なる NLRC5 発現誘導を目指した。具体的には、脱メチル化酵素 (TET1) に NLRC5 の転写因子である p53 を付け加えた融合タンパク質 (TET1-p53) を作成し (図4A)、NLRC5 遺伝子を標的とした gRNA によって

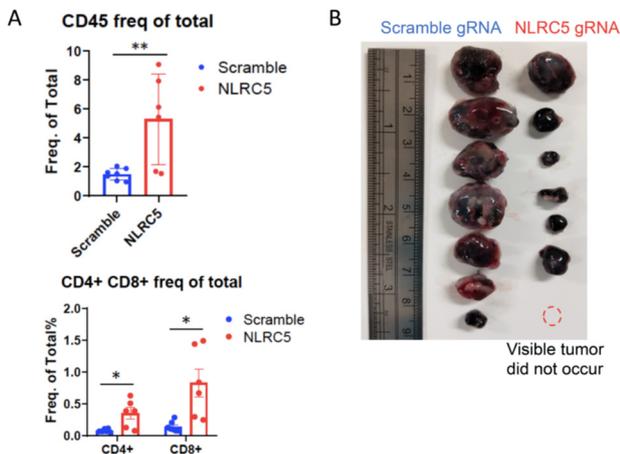
TET1-p65 を NLRC5 プロモーター領域に送り込んだ。その結果、脱メチル化酵素 (TET1) 単独を送り込んだ場合より、転写因子融合脱メチル化酵素 (TET1-p65) を送り込むことによって NLRC5 発現量の更なる増加が見られ、また MHC-I 関連遺伝子である LMP2 の発現量の上昇も得られた (図 4B)。



(図 4) 転写因子融合脱メチル化酵素の作成と NLRC5 誘導の確認

- (A) 転写因子 p65 を融合させた脱メチル化酵素が gRNA によって標的遺伝子に集積される模式図。  
 (B) NLRC5 遺伝子を標的とした gRNA 導入し、NLRC5, LMP2 発現量を qPCR で測定した。

#### 1.4 マウス悪性黒色腫モデルにおける *in vivo* のエピジェネティック編集技術の開発



(図 5) エピゲノム編集癌細胞における免疫応答

- (A) NLRC5 遺伝子エピゲノム編集を行った癌細胞に集積する T 細胞数の測定。  
 (B) NLRC5 遺伝子エピゲノム編集を行った癌細胞では腫瘍サイズの減少がみられた。

我々は上記で NLRC5 脱メチル化効果が確認された gRNA をマウス悪性黒色腫細胞株 (B16F10) に導入した。比較対照として Scramble gRNA を導入したマウス悪性黒色腫細胞株 (B16F10) を用い

た。これらの細胞を同系の C57BL/6 マウスに移植し、腫瘍内 CD8+ T 細胞数、活性度、腫瘍サイズを測定した。その結果、NLRC5 脱メチル化 gRNA を導入したマウス悪性黒色腫細胞株 (B16F10) では浸潤した免疫細胞の増加がみられ (図 5A)、顕著な腫瘍サイズの減少が確認された (図 5B)。以上の研究より、エピゲノム編集を癌における遺伝子発現をコントロールする技術として応用し、将来的に新しい癌治療戦略として有用性が期待出来る事が強く示唆された。

## 2. 発表 (研究成果の発表)

現在国際雑誌に投稿準備中である。