

CRISPR/dCas9-TET1 システムを用いた転移因子のがん細胞増殖抑制に対する潜在的機能の解明

名古屋大学大学院

生命農学研究科動物科学専攻 助教 大谷仁志

1. 研究の背景・目的

DNA メチル基転移酵素阻害剤である 5-アザシチジンは、骨髄異形成症候群および慢性骨髄単球性白血病などに対する血液腫瘍治療の第一選択薬として用いられている。しかしながら、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、申請者らを含む複数のグループが、5-アザシチジンの投与により、転位因子(TEs)の一種である内在性レトロウイルス(ERVs)の発現上昇が促されることを報告した(文献 1,2)。ERVs の転写産物が、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。さらに、申請者は、がん撲滅を目指す非営利プログラムである Stand Up to Cancer (SU2C) の Dream Team の一員として、骨髄異形成症候群患者における 5-アザシチジンの抗がん作用を決定している因子の探索、というプロジェクトに従事し、進化的に若い ERVs と自然免疫系の活性化が、患者の 5-アザシチジンへの臨床応答と有意に相関していることを報告した(文献 3)。しかしながら、5-アザシチジンの投与は、自然免疫系活性化に関与する遺伝子群に限らず、多種の遺伝子群の発現変化をも促すことから、副作用のリスクも懸念されている。従って、がん細胞特異的に特定の ERVs 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。

2. 研究の対象ならびに方法

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、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(文献 4)、特定の ERV ファミリーの発現を誘導することに挑んだ。およそ 3,000 コピーで構成される進化的に若い ERVs の一種である LTR12C ファミリー(文献 5)のコンセンサス配列を特定し、プロモーター領域である long terminal repeat (LTR) にガイ

ド RNA (gRNA) を設計することで、複数コピーの LTR12C を CRISPR/dCas9-TET1 system を用いて同時に発現誘導した。その後、自然免疫系の活性化の度合いをがん細胞株 HCT116 (colorectal carcinoma) で評価するものとした。

3. 研究結果

5-アザシチジン投与後のがん細胞において最も強い発現上昇を示すことが分かっている LTR12C の発現誘導を試みたが、CRISPR/dCas9-TET1 system では十分な発現量が得られなかったため、CRISPR/dCas9-Suntag-VP64 system を用いることとした (Fig. A, B)。Pol II のリクルーターである VP64 タンパク質を、複数の Suntag を用いることで特定の領域に集め、遺伝子の発現上昇を促す CRISPR activation system として知られている。その結果、CRISPR/dCas9-TET1 system を用いた場合と比較し、LTR12C の高い発現を誘導することに成功した (Fig. A, B)。さらに、ガイド RNA (gRNA) の適切な設計箇所を特定するため、21 種の異なる gRNA を用いたスクリーニングを行い (Fig. C)、最も効率よく働く gRNA が転写開始地点のおよそ 100bp 上流に位置することを見出した (Fig. D)。しかしながら、LTR12C の発現が誘導されているにもかかわらず、自然免疫系遺伝子群の発現に変化は見られなかった (Fig. E)。

4. 考察

CRISPR activation 後の LTR12C の発現レベルは、5-アザシチジン投与後と比較しても非常に高いものであった。従って LTR12C 由来の RNA が宿主の自然免疫系に認識されることは無いものと考えられる。ヒトゲノムには 400 種ほどの ERVs ファミリーが存在して

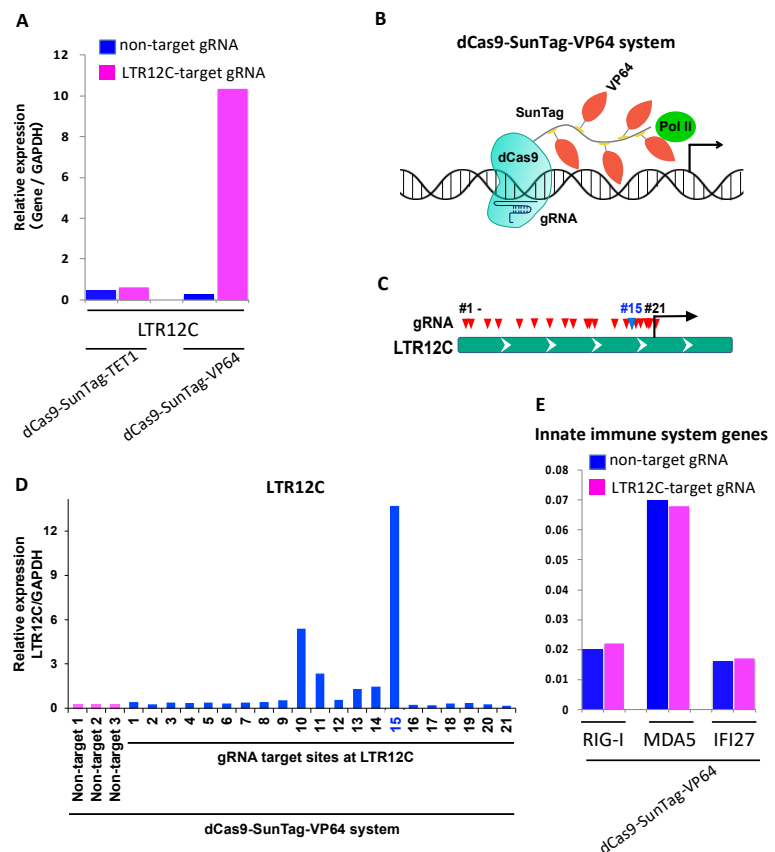


Figure | CRISPR activation system による LTR12C の発現誘導

A. LTR12C の発現レベルを RT-qPCR で示す。B. dCas9-suntag-VP64 system の構造モデル。C. gRNA のスクリーニング。アローヘッドは gRNA の設計箇所を示す。数字は D と対応する。D. LTR12C の発現レベルを RT-qPCR で示す。#15 (青字) が最も効率よく働く。E. LTR12C の発現誘導後における自然免疫系遺伝子群の発現変化を RT-qPCR で示す。

いるが、5-アザシチジン投与後に強い転写活性を示すものは20種ほどであることが、先行研究により判明している(文献3)。そのため、これら20種のERVをCRISPR activationにより活性化させることに順次挑み、自然免疫系活性化のトリガーとなるERVを特定する。特に進化的に最も若い内在性レトロウイルスであり、ウイルスゲノムの完全長が保たれているERV-Fcの機能を優先的に調査する。

5. 文献

1. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell.*, 162:961–73, 2015
2. Liu M, Ohtani H, Zhou W, Ørskov AD, Charlet J, Zhang YW, et al. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-20-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 113:10238–44, 2016
3. Ohtani H, Ørskov AD, Helbo AS, Gillberg L, Liu M, Zhou W, Ungerstedt J, Hellström-Lindberg E, Sun W, Liang G, Jones PA, Grønbaek K. Activation of a Subset of Evolutionarily Young Transposable Elements and Innate Immunity are Linked to Clinical Responses to 5-Azacytidine. *Cancer Research.*, 80(12) 2441 – 2450, 2020.
4. Sumiyo Morita, Hirofumi Noguchi, Takuro Horii, Kazuhiko Nakabayashi, Mika Kimura, Kohji Okamura, Atsuhiko Sakai, Hideyuki Nakashima, Kenichiro Hata, Kinichi Nakashima & Izuho Hatada. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9–peptide repeat and scFv–TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol.*, 34(10):1060-1065, 2016
5. Ohtani H, Liu M, Zhou W, Liang G, Jones PA. Switching roles for DNA and histone methylation depend on evolutionary ages of human endogenous retroviruses. *Genome Res.* 28:1147–57, 2018

6. 論文発表

研究課題に関して結果を発表した(発表予定)学会名・日時等を記述する。

第92回日本遺伝学会大会 2020年9月 誌面開催

「レトロトランスポゾンの活性化が抗がん剤の作用機序の一端を担う」

大谷仁志, 一柳健司, Peter A Jones