

文部科学省私立大学戦略的研究基盤

形成支援事業シンポジウム 2015

**非感染性疾患 (NCD) の病態解明
診断・治療法の開発拠点の形成**

平成 27 年 7 月 6 日

主催 自治医科大学

プログラム

- 1 開会の挨拶
13:20～13:25 永井 良三 自治医科大学 学長
- 2 イントロダクション
13:25～13:30 古川 雄祐 幹細胞制御研究部 教授
- 3 シンポジウム第1部(13:30～14:45)
13:30～13:45 二光子生体イメージングを用いた生活習慣病解析
西村 智 (分子病態研究部)
13:45～14:00 生活習慣病関連遺伝子の探索と機能的検証
岩本 禎彦 (人類遺伝学研究部)
14:00～14:15 自然免疫細胞における脂質代謝による炎症反応制御機構の解明
山室 大介 (内分泌代謝学部門)
14:15～14:30 非感染性疾患におけるインフラマソームの役割
高橋 将文 (炎症・免疫研究部)
14:30～14:45 慢性腎臓病における慢性炎症の分子機構の解明
黒尾 誠 (抗加齢医学研究部)
- 4 休憩(14:45～15:00)
- 5 シンポジウム第2部(15:00～16:15)
15:00～15:15 ARF の新規標的蛋白質 DDX5 の機能解析
多胡 憲治 (構造生化学部門)
15:15～15:30 微小環境による骨髓腫細胞の薬剤耐性獲得機構
菊池 次郎 (幹細胞制御研究部)
15:30～15:45 肺がんにおける細胞間ネットワークによる制御機構の解明
仁木 利郎 (統合病理学部門)
15:45～16:00 CRISPR/Cas を応用した子宮頸癌治療
嗟峨 泰 (産科婦人科学)
16:00～16:15 キメラ抗原受容体を利用した新規養子免疫遺伝子療法確立
水上 浩明 (遺伝子治療研究部)
- 6 特別講演(大学院特別講義)
16:15～17:15 神経反射刺激を介する病態の制御機構
北海道大学 分子神経免疫分野 村上 正晃 教授
- 7 閉会の挨拶
17:15～17:20 簗田 清次 自治医科大学 副学長

特別講演

神経反射刺激を介する病態の制御機構

北海道大学
遺伝子病制御研究所
分子神経免疫学
村上 正晃

私たちは 2012 年に重力刺激に伴う感覚-交換神経のクロストークが免疫細胞の中樞神経への侵入口を第 5 腰髄背側血管に形成することを見だし、その現象を“ゲートウェイ反射”と命名した。その後、ゲートウェイ反射の分子機構として遊走因子ケモカインの過剰産生機構“炎症回路”を発見し、炎症回路の制御遺伝子、標的遺伝子には有意に高い割合で炎症性疾患の関連遺伝子が含まれていることを証明した。また、自己免疫疾患、メタボリック症候群、慢性拒絶の病態局所では、実際に炎症回路の活性化が認められた。現在、これらをもとに炎症性疾患の新規診断・治療法の開発を目指している。

[略 歴]

平成元年 3 月 北海道大学獣医学部修了 (5 月獣医師免許取得)
平成 5 年 3 月 大阪大学大学院医学研究科博士課程修了
平成 5 年 4 月～平成 11 年 3 月 北海道大学免疫科学研究所助手
平成 11 年 4 月～平成 13 年 3 月 日本学術振興会海外特別研究員
平成 13 年 4 月～平成 14 年 8 月 コロラド大学客員准教授
平成 14 年 8 月～平成 19 年 3 月 大阪大学大学院医学系研究科助教授
平成 19 年 4 月～平成 26 年 5 月 大阪大学大学院生命機能研究科准教授
平成 26 年 5 月～現在 北海道大学遺伝子病制御研究所 大学院医学研究科教授

[研究業績]

1. Maeda, K., T. Kosugi, W. Sato, H. Kojima, Y. Sato, D. Kamimura, N. Kato, N. Tsuboi, Y. Yuzawa, S. Matsuo, M. Murakami, S. Maruyama, K. Kadomatsu. CD147/Basigin limits lupus nephritis and TH17 cell differentiation by inhibiting the IL-6/STAT3 pathway. *Arthritis Rheumatol*. (in press)
2. Harada, M., D. Kamimura, Y., Arima, H. Kohsaka, Y. Nakatsuji, M. Nishida, T. Atsumi, J. Meng, H. Bando*, R. Singh, L. Sabharwal, J.-J. Jiang, N. Kumai, N. Miyasaka, S. Sakoda, K. Yamauchi-Takahara, H. Ogura, T. Hirano and M. Murakami. Temporal Expression of Growth Factors Triggered by Epiregulin Regulates Inflammation Development. *J Immunol*. 194(3):1039-46, 2015
3. Hojyo, S., T. Miyai, H. Fujishiro, M. Kawamura, T. Yasuda, A. Hijikata, B. Bin, T. Irié, J. Tanaka, T. Atsumi, M. Murakami, M. Nakayama, O. Ohara, S. Himeno, H. Yoshida, H. Koseki, T. Ikawa, K. Mishima, and T. Fukada. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12;111(32):11786-91, 2014
4. Mori, Y*., Murakami, M.*, Y. Arima, D. Zhu, Y. Terayama, Y. Komai, Y. Nakatsuji, D. Kamimura, and Y. Yoshioka. (*equal contribution) Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultra-high field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *Int Immunol*. 26: 93-101, 2014
5. Murakami, M., M. Harada, D. Kamimura, H. Ogura, Y. Okuyama, N. Kumai, A. Okuyama, R. Singh, J.-J. Jiang, T. Atsumi, S. Shiraya, Y. Nakatsuji, M. Kinoshita, H. Kohsaka, M. Nishida, S. Sakoda, N. Miyasaka, K. Yamauchi-Takahara and T. Hirano. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Reports* 3: 1-14, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.028>, 2013.
6. Arima, Y., M. Harada, D. Kamimura, J.-H. Park, F. Kawano, F. E. Yull, T. Kawamoto, Y. Iwakura, U.A.K. Betz, G. Ma´rquez, T. S. Blackwell, Y. Ohira, T. Hirano and M. Murakami. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* 148: 447-457, 2012.

シンポジウム 第1部

二光子生体イメージングを用いた生活習慣病解析

自治医科大学
分子病態治療研究センター
分子病態研究部
西村 智

我々は二光子顕微鏡を用いた高解像度・高速イメージングにより恒常性維持反応だけでなく炎症・再生・血栓といった病的逸脱過程をマウス生体で可視化している。観察に際しては、独自ハードウェアに加え、ロバスト性・再現性を追求した半透明技術に基づく可視化および解析ソフトを開発し、自動解析により定量も行っている。観察は定常状態だけでなく、生体光操作技術により生体維持反応を引き出し、血栓形成反応、血管平滑筋の収縮、炎症・組織修復・再生、といった、恒常性維持と破綻を明らかにした。

レーザー傷害による ROS 産生を伴う血栓形成モデル、血管内皮破綻モデルと本システムを組み合わせ、血小板機能や凝固因子に異常を来す遺伝子改変動物における血栓形成過程を観察し、生体内での細胞機能を検討した。最近では、炎症と血栓、止血反応の相互の関連を明らかにしている。さらに、骨髄バイオイメージングでは巨核球からの急性の血小板造血過程を明らかにし、炎症性サイトカインの関与を示すなど、広い領域のアプリケーションを有している。

一定の侵襲性が存在するものの生体二光子イメージングは多くの生体情報が得られ、将来的な光診断・治療への重要な一歩と思われる。

生活習慣病関連遺伝子の探索と機能的検証

自治医科大学
分子病態治療研究センター
人類遺伝学研究部
岩本 禎彦

生活習慣病の多くは、多因子遺伝疾患であり、遺伝因子と環境要因が複雑に絡み合うことによって発症するが、遺伝要因は発症に 40~60%程度寄与すると考えられている。近年、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、多因子遺伝疾患に関わる膨大な数の遺伝因子が同定されてきた。しかし、未だに、生活習慣病の背後に潜む遺伝素因のほとんどを説明し切れていない状況 (missing heritability) である。それを説明する仮説として「低頻度だが遺伝子の機能に中程度の機能変化を与える遺伝的バリエーションの存在」と「遺伝-環境因子相互作用の存在」が考えられている。我々は、遺伝子多型が血清脂質レベルに与える影響について、様々な人種のゲノムサンプルを用いてその異なる効果を明らかにした。この結果は、「遺伝-環境因子相互作用」の一端を明らかにしたものと考えられた。また、様々な生活習慣病を促進する要素として考えられている内臓脂肪の蓄積に関わる *TRIB2*、*UCP1*、*GIP*、*GIPR* の遺伝子多型を見出した。さらに、*UCP2* の遺伝子多型の効果は季節に影響されることを明らかにした。現在、「低頻度だが遺伝子の機能に中程度の機能変化を与える遺伝的バリエーション」を同定するために、次世代シーケンサーを用いて、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) 関連遺伝子に関連する遺伝子の大規模なリシーケンスを行っている。また、新規関連分子の同定を目的に、低頻度バリエーションの同定を目的とした SNP アレイ (ジャポニカアレイ) を用いて、GWAS を開始した。

機能的検証の対象として、GWAS によって 8 番染色体長腕に見出された血清脂質関連遺伝子 *TRIB1* に注目し、その脂質レベル調節機序を解析した。*TRIB1* は、肝臓における脂質代謝マスターレギュレーター *MLXIPL* タンパクとの相互作用を介して脂質合成をネガティブに制御することを明らかにするとともに、マウスモデルにおいて肝臓における脂質蓄積を調節し、ヒトでも NAFLD と遺伝的に関連することを明らかにした。さらに、*TRIB1* の新たな結合パートナーとして Sin3A associated protein, 18kDA (*SAP18*) を同定し、*SAP18* の発現低下は、血清脂質の低下をもたらす、逆に肝臓内では脂肪滴の増加をもたらした。そして、それは *microsomal triglyceride transfer protein (MTTP)* のネガティブな発現制御を介して生じたことを明らかにした。遺伝解析で明らかになった新規関連遺伝子の疾患発症へのメカニズムを解析することによって、さらなるパズルの発見が期待できると考え、研究を展開している。

自然免疫細胞における脂質代謝による炎症反応制御機構の解明

自治医科大学
内科学講座
内分泌代謝学部門
山室 大介

動脈硬化形成の初期過程では、マクロファージによる脂質の蓄積(泡沫細胞)が観察される。このマクロファージに取り込まれた変性 LDL はリソソームへと輸送され、LDL 中のコレステロールエステル(CE)が酸性リパーゼ(LAL)によって酸性条件下で水解されることで、遊離コレステロール(FC)が生成される。FC は小胞体膜上に局在する acyl CoA:cholesterol acyltransferase1 (ACAT1)によって CE へと再合成され、細胞質内に脂肪滴として蓄積する。脂肪滴内に蓄積した CE は、中性域に至適 pH を有する中性 CE 水解酵素によって水解される。この中性 CE 水解酵素として、carboxylesterase 3 (CES3)、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) が報告されていたが、我々の研究グループは新たに Neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1) を見出し、NCEH1 および HSL が共にマクロファージの主要な CE 水解酵素であることを以前報告した。しかし、これら酵素の寄与度に関しては研究グループによって異なる報告がなされてきた。

本研究では、NCEH1、HSL および CES3 の選択的阻害剤を用いてマウス腹腔マクロファージにおける CE 水解活性の寄与度を検討した。その結果、NCEH1 阻害剤がマウス腹腔マクロファージにおいて主要な CE 水解酵素であることを報告した(J. Lipid Res. 2014. 55: 2033)。

また、NCEH1 欠損マウス腹腔マクロファージにおける酸化コレステロールとアポトーシスとの関連について検討した。NCEH1 欠損腹腔マクロファージに酸化コレステロールの一種である 25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)を添加することで小胞体ストレス関連分子の発現およびアポトーシスが顕著に誘導されることを見出した。この時、マクロファージ内の 25-OHC エステル体の含量が小胞体で顕著に増加し、ACAT1 阻害剤を添加することでこれらの現象は抑制された。従って、NCEH1 欠損による 25-HC エステル体の小胞体における蓄積が小胞体ストレス誘導を惹起し、アポトーシスを引き起こすことが示唆された(J. Lipid Res. 2014. 55: 2082)。

次に ACAT1 および NCEH1 の動脈硬化疾患への影響を検討するため、野生型マウス、ACAT1 欠損マウス、NCEH1 欠損マウスおよび ACAT1/NCEH1 ダブル欠損マウスの 4 系統のマウス骨髄の動脈硬化モデルマウスへの移植実験を試みた。野生型マウス骨髄を移植したマウスと比較して、ACAT1 欠損および NCEH1 欠損した骨髄を移植したマウスでは、いずれも動脈硬化病巣は悪化した。また、ACAT1/NCEH1 ダブル欠損した骨髄を移植したマウスでは、それらの病巣面積に変化は見られなかった。今後、動脈硬化病巣におけるオキシステロール含量の解析や炎症との関連についても検討していく予定である。

非感染性疾患におけるインフラマソームの役割

自治医科大学

分子病態治療研究センター

炎症・免疫研究部

高橋 将文

心血管病や腎臓病、生活習慣病といった非感染性疾患における炎症の重要性が示されており、これらの疾患で惹起されてくる炎症が、NLRP3 インフラマソームと呼ばれる新たな炎症経路を介して惹起されてくることが明らかとなってきた。NLRP3 インフラマソームは、パターン認識受容体である NLRP3 とアダプター分子 ASC、IL-1 β 変換酵素であるカスパーゼ-1 から構成される複合体で、その活性化により炎症性サイトカインである IL-1 β の前駆体が成熟型へとプロセッシングされて分泌されることにより炎症が惹起される。私たちは、これまで心筋梗塞や動脈硬化、腹部大動脈瘤、慢性腎臓病といった様々な非感染性疾患の病態において、NLRP3 インフラマソームが活性化され、その病態に重要な役割を果たしていることを報告してきた。一方、ある種の病態では、NLRP3 インフラマソーム構成分子それぞれの欠損マウスでの表現型が異なることも観察され、構成分子がインフラマソームや IL-1 β とは独立した機能を示すことも見出ししており、NLRP3 インフラマソームおよび、その構成分子の役割を解明することが、これら疾患の新たな予防・治療法に繋がることが期待される。

慢性腎臓病における慢性炎症の分子機構の解明

自治医科大学
分子病態治療研究センター
抗加齢医学研究部
黒尾 誠

ネフロン数は加齢と共に減少する。健常者でも 50 歳代には 20 歳代の約 60%まで減少すると見積もられており、慢性腎臓病（CKD）患者では当然さらに減少するはずである。ネフロン数が減ったのにリン摂取量を減らさないでいると、リン利尿ホルモン FGF23 が上昇し、ネフロン当たりのリン排泄量を増やすことでリン恒常性を維持することになる。このような代償的 FGF23 上昇は、高齢者や初期 CKD 患者で普遍的に認められ、血中リン濃度を正常に保つために必要と考えられる。

しかし、FGF23 が上昇してネフロン当たりのリン排泄量が閾値（1.0 $\mu\text{g}/\text{day}$ ）を超えると、尿細管障害と腎線維化が起こることを我々はマウスで確認した。尿細管細胞が高濃度のリンに曝されて障害を受けたと考えられる。実際、尿細管細胞を培養して培地にリンを加えると細胞障害が起きるが、その際、培地中にリン酸カルシウムが析出することに我々は気付いた。ビスフォスフォネートやクエン酸などでリン酸カルシウムの析出を抑制すると、リンの細胞毒性も抑制される。つまり、リンによる尿細管障害は、リンそのもののせいではなく、リン濃度上昇の結果析出したリン酸カルシウムのせいであることが分かった。さらにマウスの生体内イメージングで、ネフロン当たりのリン排泄量が 1.0 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超えると、原尿中にリン酸カルシウムが析出することも確認した。

通常、成人は 1 日約 1 g のリンを尿中に排泄している。ヒトのネフロン数は腎臓一つ当たり約 100 万個なので、ネフロン当たりのリン排泄量は約 0.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ である。つまり、加齢や CKD でネフロン数が半分になると、ネフロン当たりのリン排泄量が 1.0 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超え、リンが腎線維化の原因となる可能性がある。FGF23 の上昇を残存ネフロン数に対してリン摂取が過剰なサインであり、原尿中にリン酸カルシウムが析出するリスクと捉え、FGF23 を下げることを目標としたリン制限が腎線維化に対する合理的な先制治療と考えられる。

リン酸カルシウムは、血中では Fetuin-A などの血清蛋白に吸着され、蛋白との複合体ナノ粒子として存在する。このナノ粒子は Calciprotein particle (CPP) と呼ばれており、コロイド状に血中に分散している。CPP には、細胞障害や自然免疫反応を誘導する活性がある。CKD 患者では血中 CPP レベルが上昇し、血管石灰化や慢性炎症所見と相関することが臨床研究で示されている。すなわち、CPP が CKD における慢性炎症の「病原体」である可能性あり、CKD の新たな治療標的となることが期待される。

シンポジウム 第2部

ARFの新規標的蛋白質DDX5の機能解析

自治医科大学
生化学講座
構造生化学部門
多胡 憲治

ヒトの臓器・組織を構成する数十兆の細胞は、生体を維持するために、分裂・増殖と共に、静止期への移行および細胞死（アポトーシス）を繰り返しており、そのバランスは精密に制御されている。一方、がん細胞はそのコントロールを失い、無制限に増殖する。この正常細胞ががん化する過程の初期の段階で、Rb、p53、Arfなどのがん抑制遺伝子の突然変異、あるいは失活が必要であることが知られている。がん抑制遺伝子産物 Arf は p53 依存的または非依存的な機構により発がんシグナルを負に制御することが知られている。しかしながら、Arf が誘導する p53 非依存的な発がん抑制シグナルの実態には未だに不明な点が多く残されていた。私たちはこの問題を解明するため、Arf のタンパク質複合体を精製し、Arf による細胞増殖制御機構の解明を試みた。その結果、新規の Arf 結合タンパク質として、p68 DEAD-box protein (DDX5) を同定した。私たちは DDX5 がプロトがん遺伝子産物 c-Myc と結合し、c-Myc の転写活性および形質転換能に対して重要な役割を担っていることを見いだした。興味深いことに、c-Myc の強制発現は DDX5 タンパク質の発現レベルを顕著に増大させることも明らかになり、c-Myc と DDX5 は相互に活性化し合う「ポジティブフィードバックループ」を形成することで、発がんシグナルを誘導している可能性が示唆された。c-Myc と DDX5 の協調的な発現上昇は様々な白血病由来細胞株、大腸癌患者由来のサンプルにおいても確認された。以上の結果から、c-Myc と DDX5 により構成されるポジティブフィードバックループが発がんにおいて重要な役割を担っている可能性と、そのフィードバックループに対する Arf による p53 非依存的な発がん抑制機構の一つが示唆された。

微小環境による骨髄腫細胞の薬剤耐性獲得機構

自治医科大学

分子病態治療研究センター

幹細胞制御研究部

菊池 次郎

形質細胞が腫瘍化した多発性骨髄腫には主に化学療法が行われるが、患者は次第に治療抵抗性となりその予後は極めて不良である。従って、薬剤耐性機構の解明とその克服は重要な課題である。近年、エピジェネティクスと呼ばれるゲノム DNA とヒストンタンパク等から構成されるクロマチンの化学的、構造的な修飾を介した遺伝子発現制御機構が着目されている。しかしながら、薬剤耐性獲得、特に耐性獲得に重要な微小環境との相互作用を介した薬剤耐性(接着耐性)獲得時のエピジェネティクス機構は未解明であった。

私たちは、セルカルチャーインサートを用いた *in vitro* における接着耐性の再現系を用いてその解明を進めた。その結果、転写抑制的に働くヒストン修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) へのメチル化抑制が接着耐性獲得の鍵となることを明らかにした。また、メチル化の抑制は H3K27 メチル化酵素である EZH2 へのリン酸化を介した不活性化によること、メチル化抑制の下流で抗アポトーシスに働く *IGF-1*、*Bcl-2* や *HIF-1 α* の発現が亢進することを明らかにした。続いて、kinase 阻害剤のライブラリーを用いたスクリーニングの結果、PI3K/AKT/IGF-1R や CDK1/2 に対する阻害剤が EZH2 のリン酸化抑制と活性化を介して接着耐性抑制に有効なことを *in vitro* 及びマウスモデルを用いた *in vivo* で明らかにした。

以上より、骨髄腫細胞は微小環境との相互作用により、PI3K/AKT/IGF-1R kinase 経路が活性化、EZH2 がリン酸化されて不活性型となり転写抑制に働く H3K27 のメチル化を抑制し、*IGF-1* 等の発現亢進を介して耐性を獲得する機構が明らかになった。これまで、接着耐性獲得時に種々の kinase が活性化されること、*HIF-1 α* など抗アポトーシスに働く遺伝子発現が亢進することが示されていたが、細胞外のシグナルがどのようにして核内に伝達され遺伝子発現を制御するかは不明であった。今回の報告は、これまで不明だった核内への伝達機構、中でもエピジェネティックレベルのメカニズムを示す初めての報告である。一方、この経路を阻害する PI3K/Akt/IGF-1R 阻害剤は、薬剤耐性の克服を介して多発性骨髄腫の予後の改善に有効性が期待される。

肺がんにおける細胞間ネットワークによる制御機構の解明

自治医科大学
病理学講座
統合病理部門
仁木 利郎

癌の浸潤・転移などの生物学的特性を制御する因子として間質との相互作用, 微小環境が注目されている. 線維芽細胞には癌の浸潤・増殖を刺激する作用があり, 肺腺癌の浸潤部における線維芽細胞増生, 創傷治癒関連分子 laminin-5 γ 2, cox2 の高発現は予後不良因子である (Moyiya, Niki et al. Cancer 2001; Niki et al. Am J Pathol 2002). 癌間質相互作用の制御ネットワークを解明することは, 多様な肺癌を層別化するうえでドライバー変異による分類とはまた別の視点から重要な知見をもたらすことが期待される.

これまでに分化形質やチロシンキナーゼの発現などから肺腺癌を上皮型と間葉型に大別できることを報告した (Am J pathol 2010). 上皮型は EGFR, MET の発現, 活性化レベルが高く, 分化形質 (CK, Claudin, etc), 創傷治癒関連因子 (laminin-5 γ 2, cox2, etc) の発現が高い. 一方間葉型は EMT (epithelial-mesenchymal transition) 形質を示し EGFR, MET の発現は低く, FGFR1, Ax1 の発現が高い. EGFR, MET などの変異は上皮型に多く間葉型には少ない. このように上皮型と間葉型では癌の進展経路や分子標的に違いがみられる.

これまで肺癌細胞 40 株を系統的に NOD/SCID マウスの皮下に接種し in vivo での組織形態, バイオマーカーの発現を検討してきた. その結果, 上皮型では線維性間質の形成があるのに対し, 間葉型では髄様で線維性間質に乏しいこと, 上皮型と間葉型では血管構築に違いのあることが判明している. 線維性間質の主な構成細胞は α -SMA (smooth muscle actin) 陽性の CAF (cancer associated fibroblast) の形質を示す. 上皮型と間葉型では CAF の誘導性, 血管新生などの間質相互作用が異なることを示唆する結果と考えている. そこで遺伝子発データより上皮型で高発現している遺伝子, なかでも細胞間相互作用, 炎症・免疫反応に関連した遺伝子をノックダウンすることで, 上皮型において癌間質相互作用, 特に線維間質形成に関わる遺伝子の同定を進めている.

上皮間葉転換の分子機構としてさまざまな分子の関与が知られている. 研究室ではクロマチンリモデリング因子の構成分子, なかでも BRG1, BRM に注目している. BRG1, BRM の発現喪失は低分化～未分化な癌に多くみられ予後不良因子ともなる (Matsubara et al. Cancer Sci 2013). また未分化癌では, BRG1, BRM のほか ARID1A, ARID1B などクロマチンリモデリング因子の構成因子の発現喪失が複数みられる症例が多い (Yoshimoto et al, submitted). 現在, これら現象の分子機構を探るため, BRM のノックダウンにより紡錘形に形態変化が誘導される培養系を用いて解析を始めている.

CRISPR/Casを応用した子宮頸癌治療

自治医科大学
産科婦人科学講座
婦人科学部門
嵯峨 泰

CRISPR/Cas は細菌の免疫機構を応用した新しい遺伝子編集技術で、標的配列を含むガイド RNA と切断酵素 Cas9 を細胞内で発現させることにより、任意の遺伝子をノックアウトできる。子宮頸癌は高リスク型ヒトパピローマウイルス (HR-HPV) 感染が原因で発生する。すなわち HR-HPV の持つ癌遺伝子 E6 と E7 が、それぞれ宿主の癌抑制遺伝子 p53 と Rb を分解あるいは脱リン酸化し、癌化を引き起こされる。E6 を特異的にノックアウトできれば、子宮頸癌細胞で p53 の発現を回復させ死滅させることができる。また E6 は癌細胞のみで発現するため、E6 のノックアウトは正常細胞に影響しない。以上の仮説を証明するため、HR-HPV 陽性子宮頸癌細胞の E6 を CRISPR/Cas を用いてノックアウトし、細胞の変化を観察した。実験方法として、子宮頸癌細胞に化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来の Cas9 (SpCas9) を遺伝子導入し、強制発現細胞を樹立した。続いてこれらの細胞に HR-HPV の E6 を標的としたガイド RNA を、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて遺伝子導入した。その結果、子宮頸癌細胞の E6 遺伝子の標的部位に様々な変異が観察され、E6 蛋白質の発現が減少し、逆に p53 および p21 蛋白質の発現が増加した。細胞は老化を示唆する長細い形態に変化するとともに、蛍光標識したアネキシン V を指標とした検討では、多数のアポトーシス細胞が観察された。SpCas9 強制発現細胞を免疫不全マウスの背部皮内に移植した後、ガイド RNA 搭載 AAV ベクターを同部に接種したところ、腫瘍増殖が著明に抑制された。これらのことから、CRISPR/Cas による E6 ノックアウトは子宮頸癌の増殖を抑制することが示された。現在、CRISPR/Cas による E6 を標的とした子宮頸癌治療の開発を目指し、コードする遺伝子が短く AAV ベクターに搭載可能な Cas9 として最近報告された、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来の Cas9 (SaCas9) を入手し、AAV ベクター化を進めている。

キメラ抗原受容体 (CAR) を利用した新規養子免疫遺伝子療法の確立

自治医科大学
分子病態治療研究センター
遺伝子治療研究部
水上 浩明

癌に対する新たな治療戦略として、キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor; CAR) 発現 T リンパ球を用いた養子免疫遺伝子療法が注目されている。この治療法は癌患者の末梢血 T リンパ球に腫瘍特異性を付与する目的で CAR 遺伝子を導入し、体外で増幅して患者体内に戻す方法である。現在、米国では難治性造血器腫瘍を対象に、CAR 発現 T リンパ球を用いた臨床試験が実施されており、優れた治療効果が報告されている。そこで我々は、難治性 B 細胞性悪性リンパ腫・白血病を対象に、当該遺伝子療法の臨床開発および基礎研究を行っている。

臨床開発としては、臨床研究実施計画書「CD19 抗原特異的キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた難治性 B 細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究」が学内 IRB 及び厚生労働省で承認されたことから、臨床研究を開始し、患者登録を行っている。

基礎研究としては、移植後再発 B 細胞性急性リンパ性白血病を対象に、移植片対宿主病 (GVHD) を惹起せず、かつ CAR 技術を組み合わせることで効果的なドナーリンパ球輸注療法の開発を目指し、基礎検討を行っている。最初に GVHD を回避する目的で、T 細胞受容体 (TCR) を抑制する方法の開発に着手した。TCR 発現抑制の方法として、siRNA システムによるノックダウン法と CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト法を検討したが、後者の効率が優れており、現在は CRISPR/Cas9 を用いた解析を行っている。本システムは標的配列を含むガイド RNA と Cas9 ヌクレアーゼ発現ベクターを細胞に共導入することで、ゲノム上の標的配列を切断できる。予備検討として TCR α / β 鎖の定常領域に対するガイド RNA と Cas9 を Jurkat T 細胞にヌクレオフェクション法で共導入したところ、TCR 陰性群が約 40% 認められた。TCR 陰性 Jurkat クローンについて CRISPR/Cas9 による切断作用を DNA 塩基配列レベルで調べたところ、標的配列付近で挿入・欠失などのゲノム変異が認められた。現在、本システムに基づき、健常人リンパ球への遺伝子導入について検討を行っている。

これらの結果から、TCR の発現抑制には CRISPR/Cas9 システムが有効であることが示唆された。本法を用いて今後の実験を進めていきたい。