

〔研究報告書〕

## 平成28年度猪之鼻奨学会研究補助金による研究報告書

### 1. CRISPR/CAS9 システムによるゲノム編集 を用いた小細胞肺癌のがん進展機構の解析

千葉県がんセンター研究所 研究員  
末 永 雄 介

#### はじめに

小細胞肺癌は肺癌の中で最も悪性のがんであり、DNA 傷害剤による化学療法および放射線療法といった古典的な治療法以外に有効な治療法がない。小細胞肺癌の最も顕著な生物学的特徴は神経内分泌マーカー遺伝子を発現することであり、神経内分泌性格と呼ばれる。しかし、発がん過程でいかに神経内分泌性格が獲得され、がん悪性化に寄与するかは明らかではない。これまでに我々はデータベース (cBioPortal for Cancer Genome) に登録されている肺腺癌346例、小細胞肺癌71例の全エクソン解析の結果を再解析し、小細胞肺癌で特異的に変異を起こす148遺伝子を同定した。この148遺伝子の上流転写因子を統計学的に推定したところ、26転写因子が有意に選択され、そのうち6転写因子のmRNA発現量が肺腺癌に比較し、小細胞肺癌で上昇していた。これら6転写因子のうち4転写因子は個体発生において神経内分泌組織の分化を制御することが報告されている。さらに、異なるサンプルセットの小細胞肺癌77例の全エクソン解析の結果から、4転写因子の下流遺伝子ではAからGへの体細胞突然変異が鋳型鎖に比較し、非鋳型鎖において有意に上昇していた。このA>G変異の非対称性は転写量と相関すると報告されており[1]、小細胞肺癌の発がん過程でこれら4転写因子が活性化していることが示唆された。本研究ではこれら4転写因子（ここではそれぞれNE-TF1, 2, 3, 4と記す）の機能を調べるため、小細胞肺癌細胞株を用いてCRISPR/CAS9 システムによる4転写因子のノックアウトを試みた。

#### 方 法

小細胞肺癌細胞株SBC3を用いて、Neon system (Thermo Fisher Scientific) により240ngの*in vitro* 転写したgRNA及び1µgのCAS9タンパク質 (GeneArt Platinum Cas9 Nuclease) をエレクトロポレーションした。*In vitro* 転写にはMegashortscript T7 transcription kitを用い、転写したgRNAはMEGAclear Kitにより精製した。

#### 結 果

まず、最適なエレクトロポレーションの条件を調べるため、Neon systemを用いて、0.5µg GFP発現プラスミドを24条件でエレクトロポレーションした。その結果、SBC3細胞ではパルス電圧1,300V、パルス時間20ms、パルス回数2回の時に細胞生存率及びトランスフェクション効率が90%以上となり、最適であった。4転写因子のコード配列を標的にしたgRNAを設計し、*in vitro* 転写により合成したのち、CAS9タンパク質と共に上記の条件でエレクトロポレーションした。72時間後に限界希釈し、96 well plateに播種、シングルコロニーを増殖させ、最終的に56株を得た。

親株のSBC3細胞は接着細胞であるが、NE-TF3に対するgRNAを導入した2株はコロニーの培養皿への接着が弱まり、浮遊細胞として増殖した。また、NE-TF2に対するgRNAを導入した株では複数の株で液胞のような細胞内構造が観察された。NE-TF1, NE-TF4のgRNAを導入した株では株間で多様性を示し、親株に比較して核が明瞭で扁平な細胞形態を示すものと、神経突起様の構造を持つ細胞が観察された。サンガーシクエンスの結果、予期しなかったことに親株であるSBC3細胞において、NE-TF2アミノ酸置換を伴う2か所の点突然変異が検出された。これらはいずれもNE-TF2の機能ドメインに位置していた。

## 考 察

細胞が示した様々な表現型がゲノム編集の結果であるのか、off-target効果であるのかは現時点では不明であり、より詳細な検討を必要とする。NE-TF2にある変異は多型としての報告はなく、新規の変異であった。これら変異は機能欠失変異である可能性があり、NE-TF2のノックアウトは他の細胞株を用いる必要がある。

## 文 献

- 1) Mutational Strand Asymmetries in Cancer Genomes Reveal Mechanisms of DNA Damage and Repair. Haradhvala NJ, Polak P, Stojanov P, Covington KR, Shinbrot E, Hess JM, Rheinbay E, Kim J, Maruvka YE, Braunstein LZ, Kamburov A, Hanawalt PC, Wheeler DA, Koren A, Lawrence MS, Getz G. Cell. 2016; 164: 538-49.

## 2. 去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) における癌抑制型クラスターマイクロRNAの機能解析と新規治療標的分子探索

千葉大学医学部附属病院 泌尿器科  
五 島 悠 介

### はじめに

前立腺癌は、本邦で男性の癌罹患患者数に占める割合において、第一位であり、今後も罹患率・死亡率とも上昇が見込まれる癌である。前立腺癌は、当初は90%以上の症例でホルモン療法により治療効果が望めるが、いずれ耐性機構を獲得し、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となる。CRPCに対する様々な治療が行われているが、これら治療薬の予後延長効果は限定的である。この現状に対して、世界中で前立腺癌の進展機序の解明を試みているが、未だその分子機構は不明な点が多い。

近年、ヒトゲノム中には、タンパクをコードしない機能性RNAが多数存在し、実際に細胞内で転写されている事が明らかになった。マイクロRNAは、機能性RNAの一種で、配列依存的にタンパクコード遺伝子を制御するという特徴がある。現在、2,578個のマイクロRNAが報告されており、ヒトゲノム上のタンパクコード遺伝子の

半数以上がマイクロRNAの制御を受けているとの報告もある。この事は、基点となるマイクロRNAを見出し、その制御する遺伝子群を網羅的に解析する事で、新たな分子機構が見出せる可能性を示唆している。

今回、治療抵抗性となったCRPC剖検検体を得ることができた。これらに対して、次世代シーケンサーで網羅的解析を行ない、マイクロRNA発現プロファイルを作成した。このプロファイル中には、ヒトゲノム上で近接して存在する、クラスターマイクロRNAが複数含まれていることが分かった。本研究では、クラスターマイクロRNAに注目し、CRPCにおいて亢進する新規シグナルを見出し、新規治療標的分子を探索することを目的とした。

## 方 法

(1) 独自に作成した「CRPCマイクロRNA発現プロファイル」から、発現が抑制されているクラスターマイクロRNAに着目した。マイクロRNAを前立腺癌細胞株に核酸導入し、機能解析を施行した。(2) マイクロRNAが制御する分子経路について、本研究グループが考案したゲノム科学的手法 (マイクロRNAデータベースの活用、マイクロRNA導入細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析、前立腺癌臨床検体の遺伝子発現情報等) を用いて、CRPCで活性化している分子経路を見出した。(3) 見出した分子について、CRPC検体の免疫染色で発現の確認を行った。

## 結 果

非癌組織とCRPCを比較したマイクロRNA発現プロファイルを作成するとmiR-143/145クラスターが含まれていた。さらに、これらマイクロRNAについては、ガイド鎖のみならず、パッセンジャー鎖も含まれることが分かった。マイクロRNAは生合成される際、二量体を形成するが、それぞれがガイド鎖とパッセンジャー鎖と呼ばれる。パッセンジャー鎖は機能せず分解され、ガイド鎖のみがRISCに取り込まれ、機能すると考えられていた。しかし、本解析により、パッセンジャー鎖も機能する可能性が示唆された。そこで、CRPCにおいて最も発現が低下して

いたmiR-145-3p（パッセンジャー鎖）に注目して解析を継続した。miR-145-3pを前立腺癌細胞株PC3, DU145に核酸導入すると、前立腺癌細胞株の増殖、遊走、浸潤を有意に抑制し、癌抑制型マイクロRNAとして機能することが分かった。TargetScanデータベース、GEOデータベース解析により、miR-145-3pが制御する分子群として、MELK, NCAPG, BUB1, CDK1を同定した。これら4つの遺伝子は前立腺癌のcT stage, cN stageと相関して発現亢進していた。さらに、これら4つの遺伝子の発現は、前立腺癌の予後因子であることが分かった。免疫染色で、CRPC臨床検体においてこれら4つの遺伝子が高発現していることを確認した。

### 考 察

本研究では、パッセンジャー鎖に注目し、CRPCに対する治療標的となり得る分子の探索が可能であった。MELK, NCAPG, BUB1, CDK1は、いずれも細胞周期関連遺伝子であり、CRPC進展の分子機構の一端である可能性がある。現在、CRPC治療において、microtubule阻害作用を持つドセタキセルやカバジタキセルが使用され、一定の臨床効果を得ている点は、本研究の解析結果と矛盾しない。アンドロゲン受容体を標的としないう新規CRPC治療薬の探索に、本研究戦略は有用と考えられた。

### 文 献

- 1) Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, Matsushita R, Yamazaki K, Ishida Y, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer*. 2015; 113: 1055-65.

### 3. EBV 感染誘導性エピゲノム改変機構の解明

千葉大学大学院医学研究院 分子腫瘍学  
松坂 恵介

#### はじめに

胃癌は本邦において毎年約10万人が罹患し5万人が命を落とす主要な疾患であり、その対策は喫緊の課題である。その発症には2つの病原体、すなわちヘリコバクターピロリ菌とEpstein-Barr virus (EBV) の関与が知られる。EBVはヘルペスウイルスの一種で約170kbpのDNAゲノムを有し、成人の90%以上に無症候性に潜伏感染している。しかし一定の頻度で種々の腫瘍の発生に関わる側面も知られ、EBV陽性胃癌はその一例である。

一般に発がんに関わる遺伝子異常には、ゲノム構造異常とエピゲノム異常が知られる。ゲノム構造異常は点突然変異やフレームシフト、コピー数異常などの塩基配列の構造変化を伴った不可逆的な異常である。一方、エピゲノム異常はDNAメチル化やヒストン修飾に代表される、DNA塩基配列の変化を伴わずにDNAの修飾因子として遺伝子の発現制御に関与する因子の異常である。特にプロモーター領域における異常高DNAメチル化はがん抑制遺伝子の主要な不活性化機序であり、これらを適切に制御することで生理的な発現の回復が期待されることから、様々な疾患における治療標的として注目されている。

申請者は先行研究の胃癌におけるDNAメチル化の網羅的解析により、EBV陽性胃癌がDNAメチル化の高度に蓄積した超高DNAメチル化形質と呼ぶべき一群を形成すること、さらに*in vitro*のEBV感染により胃癌細胞にゲノムワイドな新規DNAメチル化が誘導され、EBV感染そのものが超高DNAメチル化形質の原因であることを証明した（申請者ら、*Cancer Res*. 2011[1]）。すなわち、胃癌という複雑な病態を示す腫瘍の中でも、EBV陽性胃癌は独特な発がん機構を有した分子生物学的にも独立した一群と考えられるが、実際にどのような機序でDNAメチル化が誘導されているのかなど、いまだ不明な点が多い。

本研究は胃癌を対象に、EBV感染が誘導するゲノムワイドなエピゲノム改変の解析と、それに関わる因子の同定を目的とする。本研究の成果により、EBVのエピゲノム異常を介した発がん機構の解明に繋がり、将来的にエピゲノム修飾を標的とした新規予防・治療概念の構築への基盤となることが期待される。

## 方 法

Akata細胞はEBV陽性Burkittリンパ腫由来の浮遊細胞であり、細胞表面に発現したIgGを抗IgG抗体で刺激することで、潜伏感染状態からウイルス粒子産生性の溶解感染に移行させることができる。Akata細胞にはネオマイシン耐性遺伝子を組み換えたEBV (rEBV) が感染しており、被感染細胞株と共培養することにより細胞接触を経て感染が成立する (Imai Sら, J. Virol. 1998)。

胃癌細胞株MKN7と正常胃上皮由来不死化細胞GES1に遺伝子組換えrEBVを感染させた後に選択薬剤G418で感染細胞を選択し、感染早期のRNAとDNAを経時的に抽出する。新規DNAメチル化の誘導される時相に焦点を当て、パイロシーケンス法にて宿主細胞とウイルスのDNAメチル化の変化を解析するとともに、両者の遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法にてゲノム網羅的に解析する。また、感染前後のエピゲノムの変化について、DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造を各々ビーズアレイInfinium、次世代型シーケンサーによるクロマチン免疫沈降ChIP (Chromatin immunoprecipitation)-seq法を用いて解析し、エピゲノム修飾の基礎データを作成する。

## 結 果

感染早期における宿主細胞とEBVのDNAメチル化変化をパイロシーケンス法にて解析したところ、GES1・MKN7いずれにおいても宿主細胞に先行してウイルスゲノムに感染後11日目から17日にかけて新規DNAメチル化が誘導されることが明らかとなった (申請者ら, J Pathol. 2017[2])。一方、宿主細胞の新規DNAメチル化はウイルスゲノムのメチル化が入り終えた17日目以降から開始され、28日までに入り終えることが示された。

さらにメチル化ビーズアレイInfinium450kを用いたゲノムワイドな解析により、宿主細胞の新規DNAメチル化誘導はゲノム全域に偏りなく生じることが示された。野生型GES1は胃癌で共通にメチル化されるマーカー遺伝子も非メチル化状態を呈し、エピゲノム的に非腫瘍性細胞の形質を維持している細胞株である。EBV感染によりGES1細胞の胃癌共通メチル化マーカー遺伝子・高メチル化胃癌・EBV陽性胃癌の各メチル化マーカー遺伝子という全ての遺伝子に新規にDNAメチル化が誘導されることが示された。すなわち、EBV感染という単独因子により、非腫瘍性胃上皮細胞においてもEBV陽性胃癌を特徴付ける超高DNAメチル化形質が獲得されることが証明された。

一方、感染早期におけるDNAメチル化誘導時の遺伝子発現をRNA-seq法にて解析したところ、特にEBV遺伝子については約80種類の遺伝子が発現していることが明らかとなり、ウイルスによる宿主細胞への能動的な相互作用を示唆する結果を得た。さらにEBV感染前後におけるヒストン修飾をChIP-seq法にて解析したところ、感染前後で遺伝子プロモーター領域やエンハンサー領域にダイナミックなエピゲノム改変が生じていることが明らかとなった。今後、どの遺伝子がエピゲノム修飾改変に寄与しているか同定すべく、機能解析を進めていく予定である。

## 考 察

EBV感染を用いたエピゲノム改変実験は、(1) ウイルス感染という実際の腫瘍でも起こっている生理的な現象を通じて、(2) 遺伝子の発現抑制を生じさせるほどに高密度の新規DNAメチル化誘導を、(3) 4週間以内という短期間で、(4) 100%の再現性を以て生じさせる、という世界にも類を見ない系である。これまでエピゲノム修飾機構の解明が滞っていた原因のひとつとして、短期間に効率よくエピゲノム改変を生じさせる系が存在しなかったことが挙げられるが、本研究法を用いることでこれまで明らかになっていなかったエピゲノム修飾機構が解明されることが期待される。

## 文 献

- 1) Matsusaka K, Kaneda A, Nagae G, Ushiku T, Kikuchi Y, Hino R, Uozaki H, Seto Y, Takada K, Aburatani H, Fukayama M. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res.* 2011; 71: 7187-97.
- 2) Matsusaka K, Funata S, Fukuyo M, Seto Y, Aburatani H, Fukayama M, Kaneda A. Epstein-Barr virus infection induces genome-wide de novo DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelial cells. *J Pathol* 2017. in press.

### 4. 免疫チェックポイント阻害剤の作用機序 説明と薬効予測を目的とした抗体医薬の薬 物動態解析

千葉大学大学院薬学研究院 臨床薬理学研究室  
島山 浩 人

#### はじめに

近年、免疫チェックポイント阻害剤であるニボルマブがメラノーマや肺癌治療を目的に日本や米国、欧州で適応承認された。ニボルマブは細胞性免疫を担う細胞障害性CD8陽性T細胞（以下CD8(+)T細胞）の表面のPD-1(Programmed cell death 1)分子を標的とした抗体医薬であり、そのリガンドPD-L1発現癌細胞に対するT細胞の免疫寛容を解除し、癌免疫を活性化することで抗腫瘍効果を誘導する。悪性度の高いメラノーマ、肺癌、腎癌患者において従来の化学療法と比較して有意に奏効率や生存率の延長が示され、癌三大療法に次ぐ第四の免疫療法として臨床での使用が急速に広まりつつある。従来の治療と比べて抗腫瘍効果が優れてはいるものの、ニボルマブの投与で癌の縮小が認められるのは、標的分子PD-1やPD-L1陽性患者で~40%程度である。またPD-1陰性患者でも奏効率が5%程度認められている。ニボルマブの薬効を予測するモデルの構築は、患者の治療の成功確率の向上という観点に加えて、薬価が非常に高く1年間の治療薬剤費が1,500万円にも上るため、医療経済上も社会的意義が大きい。また、抗体医薬であるニボルマブは分子量が約15万の高分子タンパク質であり、従来

の抗がん剤と物性が大きく異なるにもかかわらず、それら抗体医薬の薬物動態学的特性を考慮した免疫チェックポイント阻害剤の薬効予測のモデリングは皆無である。また、これまで免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性や耐性のモデルに関する報告は皆無であり、モデル動物を用いた系統的な比較研究が困難であった。そこで、本研究では9種類のマウスがんモデルを用い、腫瘍組織中のPD-1/PD-L1発現量の網羅的評価を行い、さらにPD-1抗体による抗腫瘍効果から感受性・耐性モデルを見出すこととした。

## 方 法

### 1. 腫瘍組織中の遺伝子発現評価

乳癌(4T1, MM48)、大腸癌(CT26, Colon26, MC38)、肺癌(LL/3)、メラノーマ(B16F1, B16F10)、骨肉腫(LM8)の9種類のマウスがん細胞株を、それぞれ同系統のマウスBALB/c, C57BL/6もしくはC3H(雌, 6週齢)の背部皮下に移植( $1-3 \times 10^6$  cells/mouse)、腫瘍体積が200-500mm<sup>3</sup>の時点で腫瘍を摘出した。30-50mgの腫瘍組織をRNAzol(Molecular research center)中でホモジナイズし、Direct-zol RNA MiniPrep Kit(Zymo Research)を用いてRNAを抽出した。RNA濃度はNanoDrop One(Thermo Scientific)を用いて定量した。逆転写反応(ReverTra Ace qPCR RT Master Mix, TOYOBO)によりcDNAを合成し、TUNDBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いApplied Biosystems StepOneにてreal-time PCR反応を行い標的遺伝子の発現量を測定しGAPDHを内部標準とした $\Delta\Delta C_t$ 法にて評価した。

### 2. 抗PD-1抗体感受性、耐性試験

CT26, MC38, B16F10細胞を同系統のマウスBALB/cもしくはC57BL/6(雌性, 6週齢)の背部皮下に移植( $1 \times 10^6$  cells/mouse)し、5, 8, 12日目にコントロールIgG(BE0089, BioCell)もしくは抗マウスPD-1抗体(BE0146, BioCell)を200 $\mu$ g/mouseの投与量で計3回腹腔内投与し、腫瘍体積を指標に腫瘍増殖を評価した。

## 結 果

### 1. 腫瘍組織中のPD-1/PD-L1 遺伝子発現評価

9種のがんモデルの腫瘍組織中のPD-1の発現量は低発現のB16F1から高発現Colon26で約90倍の差があり、モデル間で大きく異なることが示された。PD-L1に関しても低発現のB16F1から高発現の4T1で約10倍の差が示された。また、両遺伝子の発現量の相関性を示す決定係数 $R^2$ は0.70と9種のモデルを通じてよく相関していることが示された。

### 2. 抗PD-1抗体感受性・耐性試験

遺伝子発現の評価から、PD-L1低発現（陰性）モデルとしてB16F10、発現陽性の中発現モデルとしてMC38、高発現モデルとしてCT26を選択した。抗体投与後の腫瘍体積を指標に腫瘍増殖を評価した。PD-L1低発現B16F10ではコントロールIgG投与群とPD-1抗体投与群で腫瘍増殖に有意な差は見られなかった。PD-L1中発現MC38ではPD-1抗体投与群で腫瘍増殖が有意に抑制され、10匹中5匹は腫瘍が消失した。PD-L1高発現CT26では腫瘍増殖に有意な差は見られなかった。以上より、B16F10とCT26は耐性モデル、MC38は感受性モデルであることが示された。

## 考 察

本研究で9種類のモデルにおいてPD-1/PD-L1発現量を網羅的に評価した結果、両者の発現量は相関していた。これは免疫抑制の状態においては両分子とも協調的に機能していると考えられる。これまでにPD-1やPD-L1発現量によってニボルマブの治療効果はある程度相関することが示されている。PD-1/PD-L1発現が陰性患者では奏効率は低く、これはPD-L1低発現のB16F10が相当すると考えられる。一方でPD-1/PD-L1陽性患者では奏効が見られるがこれはMC38が、また陽性患者でも奏効がみられないものはCT26が相当すると考えられる。

今後は、感受性・耐性試験におけるモデルを追加し、感受性・耐性モデル分類が確立できれば、PD-1抗体の体内や腫瘍内動態の違いと、それに影響を与える免疫学的特性やがん微小環境の特性を明らかにできると考えている。

## 文 献

- 1) Borghaei H, et al. N Engl J Med 2015; 373: 17.
- 2) Taube JM, et al. Clin Cancer Res 2014; 20: 19.