



本件の報道解禁につきましては、平成30年10月18日
(木)午後11時(日本時間)以降にお願いいたします。

平成30年10月17日

ゲノム編集を応用し、遺伝子を高度に活性化する新技術 (TREE システム) を開発 ～がん抑制遺伝子の活性化によるがんの増殖阻害への応用に期待～

【本研究成果のポイント】

- ゲノム編集に汎用される CRISPR-Cas9 を改変し、DNA 配列を書き換えることなく遺伝子のはたらきを ON にする新技術 (TREE システム) を開発しました。
- TREE システムを用いることで、さまざまな細胞での遺伝子活性化を従来技術よりも高度に誘導できることを証明しました。
- 膵臓がん細胞において、がん抑制遺伝子の産物である E-カドヘリンタンパク質の発現レベルを約 30 倍に高めることに成功しました。

【概要】

広島大学大学院理学研究科 佐久間 哲史 講師および 山本 卓 教授らは、国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野 牛島 俊和 分野長および川崎医科大学総合外科学講座 深澤 拓也 准教授らと共同で、ゲノム編集^{*1}を応用した遺伝子の活性化技術 (TREE システム) を開発しました。ゲノム編集ツールの一つである CRISPR-Cas9^{*2}を改変して構築された本システムでは、目的とする遺伝子の周辺に活性化タンパク質を高度に集積させることができ、従来技術よりも高い活性化効果を得ることができます。遺伝子を活性化する技術は、DNA 配列を書き換えることなく遺伝子のはたらきを ON にできることから、安全性の高いがん治療などに役立てられることが期待されます。

本研究成果は、10月18日午前10時(日本時間18日午後11時)、米国 Mary Ann Liebert 社の科学雑誌『The CRISPR Journal』に掲載される予定です。なお本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的がん医療実用化研究事業「癌関連遺伝子の発現を多重制御するエピゲノム編集ベクターの開発と応用」(研究代表者: 佐久間哲史) 等による支援を受けて行われました。

【論文に関する情報】

タイトル

“Three-Component Repurposed Technology for Enhanced Expression (TREE): Highly Accumulable Transcriptional Activators via Branched Tag Arrays”

著者名

Atsushi Kunii¹, Yoshihiro Hara², Mitsumasa Takenaga¹, Naoko Hattori³, Takuya Fukazawa⁴, Toshikazu Ushijima³, Takashi Yamamoto^{1*} & Tetsushi Sakuma^{1*}

- 1) 広島大学大学院理学研究科
- 2) 元広島大学大学院理学研究科
- 3) 国立がん研究センター研究所
- 4) 川崎医科大学

*: 責任著者

掲載誌

<https://www.liebertpub.com/loi/crispr>

DOI

10.1089/crispr.2018.0009

【背景】

遺伝子の発現を制御する技術は、ゲノム編集の派生技術の一つに位置づけられます。ゲノム編集が、

ゲノム DNA を切断して DNA 配列そのものを書き換えてしまうのに対し、発現調節技術では、DNA を認識して結合する活性を残しつつ、DNA を切断する活性をなくした改変型のシステムを利用して、遺伝子を読み取るはたらきのみを調節します（図 1）。がんなどの疾患では、DNA 配列に変異が入るケースだけでなく、この遺伝子の読み取りが異常に亢進したり、逆に抑制されたりすることがその原因となっている場合があります。すなわち、人工的にがん遺伝子の読み取りを抑えたり、がん抑制遺伝子の読み取りを活性化させたりすることにより、これらの原因によって起こるがんを治療できる可能性があります。実際に、本研究と同じく広島大学と川崎医科大学、国立がん研究センター研究所の三機関共同研究により、前者のがん遺伝子の抑制に基づく扁平上皮がん治療用技術を開発し（特願 2018-081795、発明名称：「増殖性疾患を処置するための医薬組成物」出願日：平成 30 年 4 月 20 日、出願人：広島大学）、本年 6 月に米国の科学雑誌『Oncotarget』に発表しています（参考論文 1）。

参考論文 1

Development of an integrated CRISPRi targeting Δ Np63 for treatment of squamous cell carcinoma.

Yoshida M, Yokota E, Sakuma T, Yamatsuji T, Takigawa N, Ushijima T, Yamamoto T, Fukazawa T, Naomoto Y.

Oncotarget. 2018 Jun 26;9(49):29220-29232. doi: 10.18632/oncotarget.25678.

ニュースリリース：

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/45957>

本研究では、より技術的ハードルの高い後者の戦略、つまりがん抑制遺伝子の読み取りを活性化するためのシステム開発を行い、後述する新規技術を確立しました（特願 2018-041322「標的遺伝子にエフェクタータンパク質を集積するための組成物、およびその利用」、出願人：国立大学法人広島大学、出願日：2018 年 3 月 7 日）。

【研究成果の内容】

遺伝子を活性化させるシステムとして、これまでに、DNA 結合タンパク質（たとえば DNA 切断活性を不活化させた Cas9 である dCas9）に活性化ドメインを直接連結させた第一世代の構造（図 2 A）や、dCas9 と複合体を形成する sgRNA に活性化ドメインを呼び込む第二世代の構造（図 2 B）などが報告されてきました。しかしながら、これらの構造では必ずしも十分な活性化効果が得られるとは限らず、より高い効果を発揮する新規システムが望まれていました。そこで本研究では、まず sgRNA にアダプター分子となるマルチタグタンパク質を呼び込み、更にそのタグの一つ一つに活性化ドメインが結合することで、目的の活性化ドメインが高度に集積し、より強い活性化が誘導されるようなシステムを構築しました（図 2 C）。本システムは、「発現増強のための 3 要素型の別用途化技術」を意味する Three-component Repurposed technology for Enhanced Expression の略称として、TREE システムと命名されました。システムを模式的に示す際にツリー状の形状となることも、名称の一因となりました。

TREE システムの優位性は、複数の細胞株を用いて、複数の遺伝子座で実証されました。そのうちのひとつが、MIA-PaCa2 とよばれる膵臓がん細胞での CDH1 遺伝子の発現増強です。CDH1 遺伝子は、がん抑制遺伝子であり、細胞接着に関わる E-カドヘリンタンパク質をコードしています。MIA-PaCa2 細胞において、E-カドヘリンタンパク質の発現量は本来検出限界以下であり、既存の第一世代の活性化システムを作用させた場合でも検出可能な発現は認められませんでした。既存の第二世代の活性化システムでは、ごくわずかに発現が検出可能になりましたが、本研究にて開発した TREE システムを用いることで、第二世代システムによる発現レベルの 30 倍におよぶ活性化効果が実現されました（図 3）。

【期待される波及効果と今後の展開】

TREE システムは、本研究の実施例で示されたように、がん抑制遺伝子を活性化し、がんの治療に結びつけるための強力なツールになると考えられます。また、同様の手法でがん遺伝子を活性化することもできることから、がんの発症をモデル化するための技術としても活用されることが期待されます。更に、本システムによって活性化させる遺伝子の対象はがん関連遺伝子に限定されませんので、たとえば再生医療用細胞を作製するためのリプログラミングに応用することも可能と考えられます。

他にも、集積させるタンパク質ドメインを、活性化ドメインから他の機能を有するものに変更することで、遺伝子の活性化とは異なる使い方をすることも将来的に可能になるかもしれません。たとえ

ば DNA やヒストンの化学修飾を改変する、いわゆる「エピゲノム編集」や、特定の染色体領域に蛍光タンパク質を集積させて可視化するクロマチン標識技術などが例として挙げられます。このように、TREE システムは、高度遺伝子活性化技術として極めて有望であるだけでなく、さまざまな用途への応用も可能な汎用的基盤技術であるといえます。

【参考資料】

■用語解説

※1 ゲノム編集

標的とするゲノム DNA 領域に対して DNA 二本鎖切断を誘導し、その修復過程において、標的領域への欠失や挿入変異を導入したり、ドナーベクターのゲノム DNA への組み込みを促進することで遺伝子を挿入したりする最先端の遺伝子改変技術。本研究ではこれを応用し、ゲノム DNA を切断しないよう改変を加えたシステムを利用している。

※2 CRISPR-Cas9

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated protein 9 の略で、ゲノム編集を可能にする人工 DNA 切断酵素の一つ。本来、Cas9 と呼ばれるタンパク質が sgRNA (Single-guide RNA) と複合体を形成し、標的 DNA 配列を認識して切断するが、本研究では Cas9 に変異を加えることで、DNA の認識活性を残しつつ切断活性を不活化させている。

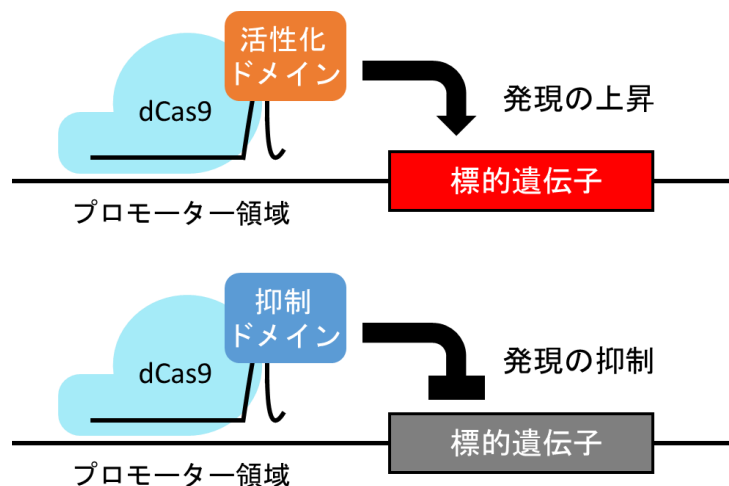


図1 ゲノム編集を応用した発現調節技術のイメージ

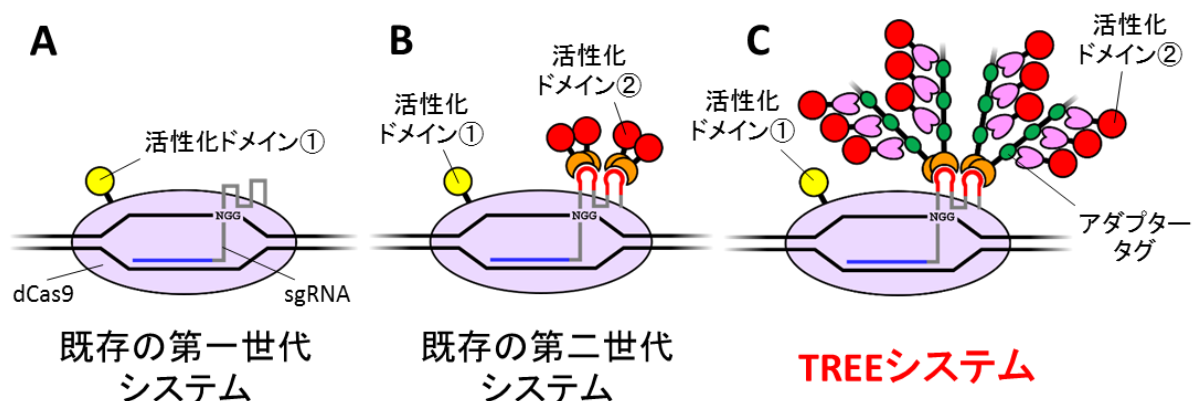
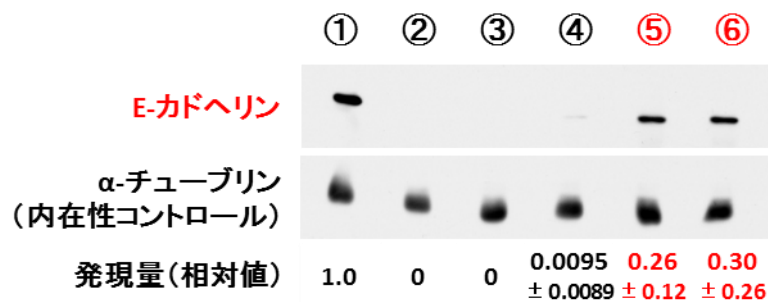


図2 既存の遺伝子活性化システム（第一世代・第二世代）と TREE システムの模式図



- ① ポジティブコントロール(E-カドヘリン発現細胞抽出液)
- ② 活性化システム非導入MIA-PaCa2細胞抽出液
- ③ 既存の第一世代システム導入MIA-PaCa2細胞抽出液
- ④ 既存の第二世代システム導入MIA-PaCa2細胞抽出液
- ⑤ TREEシステム(ver.1)導入MIA-PaCa2細胞抽出液
- ⑥ TREEシステム(ver.2)導入MIA-PaCa2細胞抽出液

図3 ウェスタンブロット法による E-カドヘリンタンパク質の発現解析

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻
講師 佐久間 哲史 (さくま てつし)

TEL: 082-424-6292

E-mail: tetsushi-sakuma@hiroshima-u.ac.jp

教授 山本 卓 (やまもと たかし)

TEL: 082-424-7446

E-mail: tybig@hiroshima-u.ac.jp

<広報に関すること>

広島大学財務・総務室広報部広報グループ

主任 佐々木 和人 (ささき かずと)

TEL: 082-424-7323 FAX: 082-424-0739

E-mail: koho@office.hiroshima-u.ac.jp

発信枚数: A4版 4枚 (本票含む)