

研究報告書

「光操作型 -生体内不均一変異細胞誘導と変異細胞の挙動解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研究者: 丸山 剛

1. 研究のねらい

青色 LED 照射により、1 つのがん変異をもつ変異細胞の発生を時空間的に制御する革新的システムを開発する。これにより、変異細胞の挙動の 1 つである、「正常細胞による変異細胞の排除現象」をマウス生体内にて、世界で初めて解析する。「発がんは、細胞に 1 つのがん遺伝子変異が生じ、段階的に変異が蓄積することでがん化すること」が通説となっている(図 3 左)。しかし、「1 つの変異を生じた変異細胞がどのような挙動を示すか」はこれまで全く観察されたことがない。本研究では、CRISPR ノックイン技術と光技術を融合させ、時空間的変異細胞誘導モデルシステムの構築を図ることで、1 つの変異が入った変異細胞の挙動という、これまで全くのブラックボックスであった機構の解明に挑む。

2. 研究成果

(1) 概要

これまでのコンディショナル・ノックインマウスに取って代わる、光操作性コンディショナル・ノックインマウスを開発し、がんの発生機序を解明する。詳細として、青色 LED ナノデバイスにより、特定のがん遺伝子変異細胞を意図的に誘導する革新的変異細胞誘導マウスモデルを開発する。さらに、マウスモデルを使うことにより、世界で初めての生体内における 1 つのがん遺伝子に変異を持つ変異細胞の挙動解析を行う。

特に、**について**はがん変異細胞が排除される機構解明を同時並行して行うことで、解析対象とする機構を同マウスモデルにて証明する。

(2) 詳細

変異細胞の動態解析のための光照射型・変異細胞—誘導技術の開発

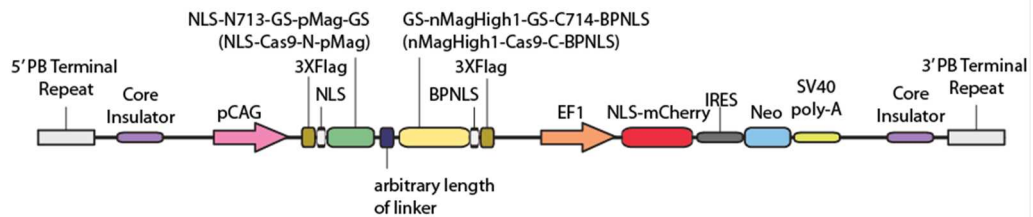
研究経過

1)-1 青色 LED 照射によって活性化するスプリット Cas9 の最適化

スプリット Cas9 の N 末端ドメインに pMag を、C 末端に nMag を融合させた後、ベクターにのせることで、pPB-EF1-pMag-Cas9^{NT}-P2A-nMag-Cas9^{CT} とする。同コンストラクトを HEK293 細胞に遺伝子導入することで、KRas 遺伝子座への G12V 変異ノックインが可能かどうかを検討した。その結果、ほとんどの細胞でノックインは確認できなかった。このとき、通常の Cas9 をコントロールとしたが、ノックイン効率は 1%程度とこれまでの報告と一致していたため、スプリット Cas9 のゲノム編集効率が低いことが予想される。

この問題点を解決するために、以下のコンストラクトを作成し、ノックイン効率を再検討した。

pPB533A-1-Based photo-activatable **linkered BPNLS**-spCas9 EF1-**NLS-mCherry**



上記プラスミドコンストラクトは、スプリット Cas9 の両端に p および nMag を保持したまま、Cas9 の N 末端および C 末端をリンカーにて接合したコンストラクトである。これにより分子内 FRET の要領で、より効率的な光依存的な Nuclease 活性を得ることが可能であると予想される。

1)-2 KRasV12 変異導入のためのノックイン検討

変異細胞の発生には、CRISPR/Cas9 ノックイン (KI) 法 (homology-independent targeted integration: HITI) をもとに、「蛍光タンパク質 Venus の挿入」および「KRas がん変異 G12V の KRas のプロモーター下流への挿入」を行う。当初、相同性配向型修復 (HDR) を基にした相同組み換えをもとに、KRas 変異を誘導する予定であった。しかし、以下の点を考慮し、変異型 KRasV12 を HITI 法により挿入することとした。

1. KRas 遺伝子の大きさが 567 bps と比較的小さい
2. 分化した上皮細胞は HDR 効率が比較的低い
3. HDR の場合と異なり、HITI 法ではフランキングアームがほとんど必要ない

上記の点より、HITI 法に移行し、HEK293 細胞でのノックイン効率を検討した。

2) 新規マウス作成法の導入

これまで、受精卵へ Cas9、sgRNA、およびテンプレートドナーを導入することで、ゲノム編集を行ってきた。上記の方法では、時間および実験費用が大きな問題となる。そのため、GONAD 法を導入することで、上述した煩雑さを克服することができると考えられる。

3) 照射用デバイスの開発

マウス *in vivo* にて光照射依存的に変異細胞を誘導するため、マウス生体内に挿入可能かつ遠隔での無線給電による光励起システムを東京工業大学の藤枝俊宣講師と共同で開発する。

進捗状況、成果

- 1)-1 HEK293 細胞を用いて検討したところ、通常の Cas9 程度のノックイン効率を得られた。また、照射時間および照射強度がゲノム編集効率へ大きく寄与することが分かっているため、さらなる検討を行っている段階である。
- 1)-2 NHEJ を基にして KI を誘起する HITI 法では、ドナーテンプレートにおいて、ホモロジーアームが不要となる。ホモロジーアームの代わりに、CRISPR/Cas9 システムにおける KRas のガイド配列を、ノックインしたい DNA フラグメントの両端に逆向きに挿入する。これにより、NHEJ を基にした KI を誘起することが可能となる。リンカー付きスプリット Cas9 (図中の Linkered BPNLS-paCas9) の安定発現株である HEK293 細胞を用いて、光照射後における Venus-KRasV12 のノックインを確認したところ、RasV12 に特徴的な

膜局在化した Venus の蛍光が確認された。

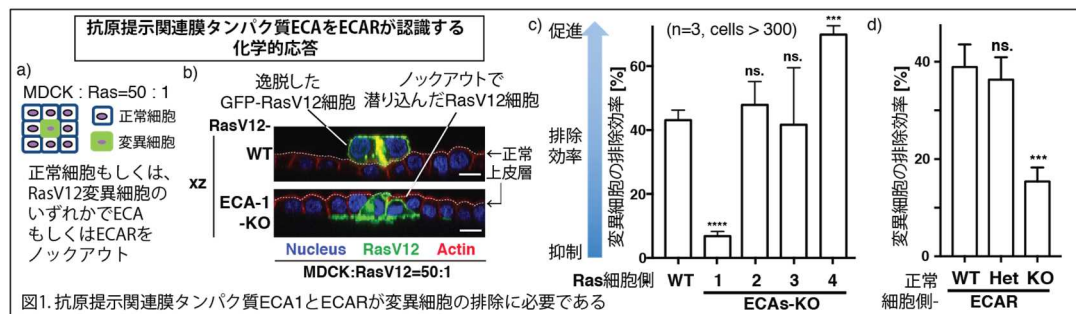
- 2) これまで特定の DNA フラグメントをゲノムに挿入するにあたり、受精卵へ CRISPR コンポーネントをマイクロインジェクションもしくはエレクトロポレーションを用いて導入してきた。しかしながら、ノックイン効率は欠損効率よりも低いため、多くのマウスが必要となる。これらの問題を GONAD 法の導入により解決した。GONAD 法においては、自然交配したマウスの卵管膨大部内に CRISPR コンポーネントを注射し、卵管内でエレクトロポレーションによる遺伝子導入をおこなう。そのため、受精卵を一旦体外に取り出して、仮親マウスに移植するなどの煩雑な過程をスキップできる。実際に、卵管膨大部でのエレクトロポレーションの後、二日後の受精卵においてゲノム編集が可能である結果を得ている。
- 3) ナノシートに電子回路を組み込むことで、外部からの電磁波照射により青色 LED を発光させるシステムを開発した。以下に成果として、東京工業大学の藤枝俊宣講師との共同研究による特許明細書および論文の要約を記載する。
 1. 高分子超薄膜(ナノシート)と印刷配線からなり、微小細管(注射針・カテーテル・内視鏡トロッカー)や容器(カプセル)に収納し、その後に放出可能な機械的柔軟性と導電性を有する薄膜状構造体(総膜厚: 10 μm 未満)である。
 2. 基材表面に予め有機コロイド系導電性物質(グラフェンフレーク, PEDOT:PSS)をインク受容層として印刷しておくことで、受容層に選択的に金属性ナノ粒子を集積できる。これにより構造的にも電氣的にも欠陥の無い導電配線が得られる。
 3. グラフェンフレークの層状構造を利用することで、水溶性支持膜(ポリビニルアルコール)にてグラフェンと金ナノ粒子からなる導電配線を基材から剥離できる。この時、基材の種類は限定されないため、例えばガラスなどの耐熱性基材を選択すれば配線抵抗値を下げるための高温プロセスを適用できる。
 4. 基材から剥離した配線を別途調製したナノシートに転写し、これをさらに別のナノシートにて被覆することで、薄膜の厚さに応じて注射針・カテーテル・カプセルに収納して放出可能な薄膜状導電体を供する。
 5. 4. と類似の方法で剥離した微細配線を絶縁性高分子にて被覆し、その先端をハサミなどの刃物で切断すれば電極部を簡便に露出できる。この時、印刷のデザインにより配線の幅と厚さを制御することで、測定対象の生体電位に応じたインピーダンスが得られる。また、切断を繰り返すことで何度でも同等のインピーダンスを有する電極を作製できる。
 6. 当該デバイスを利用することで、生体内部への電子機器の低侵襲な埋め込みが可能になるため、生体内部へのセンサ・光源・薬物徐放機器の設置が可能になる。本デバイスの応用分野には、脳科学・光遺伝学・薬物送達システムが見込まれる。

周辺正常細胞の変異細胞に対する排除能惹起機構の解明

研究経過

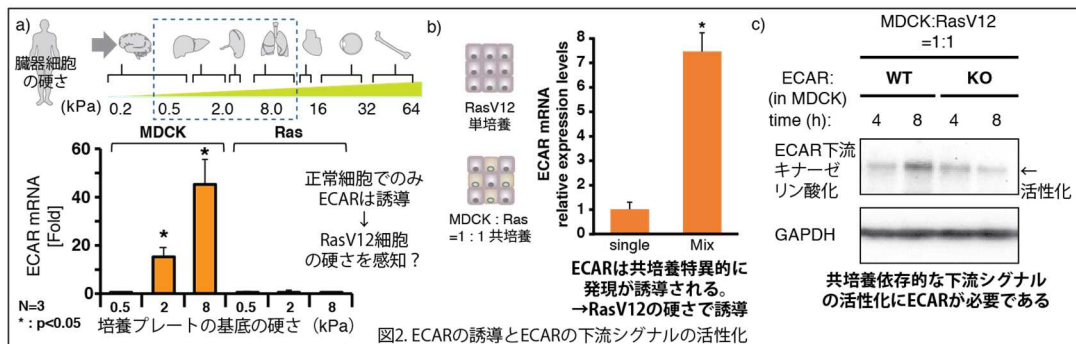
- 1) 抗原提示関連膜タンパク質リガンドとトリガンドに対する受容体の同定
Ras 変異依存的なタンパク質発現のプロファイル変化は、この抗原提示を亢進することが

知られている。そこで、抗原提示関連膜タンパク質 ECA1 から 4 が変異細胞の排除に関与するかを検討した。テトラサイクリン (Tet) 誘導性 pTRE3G-RasV12 安定発現 MDCK 細胞 (Ras 細胞) を正常 MDCK 細胞 (正常細胞) と共培養すると、Tet 依存的に Ras 細胞は正常上皮細胞層から排除される。一方で、ECAs を欠損した Ras 細胞と正常細胞を共培養すると、ECA1 でのみこの変異細胞の排除が低下した (図 1a,b,c)。また更に、正常細胞側の受容体 ECAR のノックアウト解析でも、変異細胞の排除効率が減弱することがわかった (図 1d)。



2) 同定した ECAR の誘導機構 (上流) および下流シグナルの解析

RasV12 変異細胞は myosin, plectin, paxillin などの骨格形成因を集積させる。特に myosin は正常細胞との境界面に集積することで変異細胞の細胞膜テンションを亢進させ、細胞を硬化させる。正常細胞はこの RasV12 細胞の硬さをセンスすることが示唆されている (Kajita et al., Nat commun 2014)。興味深いことにこれと一致して、すでに同定している正常細胞側の受容体 ECAR はこの変異細胞の硬さを認識し、発現誘導されるという結果を得た (図 2a,b)。また更に、Ras 細胞で発現する ECA1 を認識した ECAR は下流のチロシンキナーゼを活性化することが分かってきた (図 2c)。



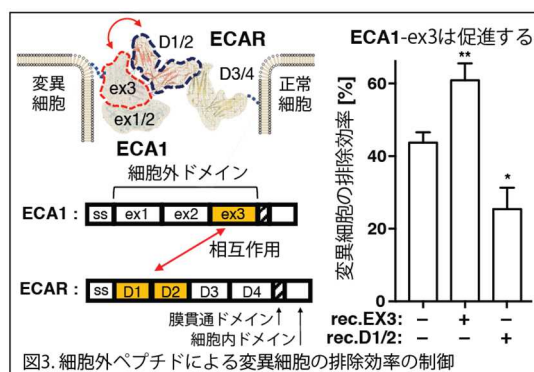
3) ECA の細胞外ドメイン・ペプチドは正常細胞の攻撃能を高める

類似タンパク質の結晶構造解析を基にした結合予測および *in vitro* の結合結果より、ECA1 の ex3 および ECAR の D1/2 ドメインが直接的に結合することをすでに示している (図 3 左)。それぞれのリコンビナントタンパク質を細胞に処理したところ、ECA1-ex3 は変異細胞の排除を促進した (図 3 右)。一方で、ECAR-D1/2 は排除効率を抑制した。これらのリコンビナントタンパク質を最適化することで、マウス生体内で変異細胞の排除を促進できるかを検討する。これにより、予防的治療法の確立に必須である薬剤シードを創出する。

進捗状況、成果

1)から 3)において、薬剤シードとしての ECA1-ex3 を創出し、国内特許を取得した。加えて、ヒト上皮正常細胞を樹立し、同細胞を用いた造腫瘍アッセイにより、変異細胞の腫瘍化の指標としたアッセイにおいて、ECA1-ex3 が腫瘍形成を抑制することを見出した。

同研究結果は、海外特許申請中かつ論文発表予定である。



3. 今後の展開

現在構築中の光照射依存的に変異細胞を誘導できるマウスを用いて、ECA1-ex3 の効果を *in vivo* レベルで実証する。また、正常細胞側の ECAR の発現誘導については、変異細胞の硬さが関与することが分かっている。そのため、正常細胞がどのようにしてこの硬さを認識し、ECAR を誘導するかという機構を解明する。これにより、より効率的に変異細胞の排除を促進できる予防的治療の可能性を広げることができる。

4. 自己評価

マウス *in vivo* で光照射するためのインジェクタブル・デバイスを共同研究により開発した。また、光活性化型 CRISPR システムの最適化を行っているが、まだ *in vivo* で活用するレベルには達していないため、当初の目標の 8 割程度の達成度といえる。しかし、光依存的に特定遺伝子を誘導する GAVPO システムへ変更し、構築したインジェクタブル・デバイスを利用することで、*in vivo* での光照射依存的な変異細胞誘導が可能となる。このシステムを用いることで、目標は達成できると予想される。一方で、がん変異細胞の排除機構について、これまで全く不明であった機構を見出すなど、生命科学領域において大きな波及効果を生む発見に至っている。この機構を基にした薬剤の開発は、がん領域において科学的な根拠に基づいて予防的に治療するという新たな治療法を確立するための大きな第一歩となる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- 1) Tetsu Y, Kido Y, Hao M, Takeoka S, **Maruyama T**, Fujie T
Graphene/Au Hybrid Antenna Coil Exfoliated with Multi-Stacked Graphene Flakes for Ultra-Thin Biomedical Devices
Advanced Electronic Materials (2019) *in press*
- 2) Kasai N, Kadeer A, Kajita M, Saitoh S, Ishikawa S, **Maruyama T*** (責任著者), Fujita Y*.
The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation.
Sci Rep. (2018) Feb 1;8(1):2097.
- 3) Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, **Maruyama T**, et al.

	Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes <i>Nat Cell Biol.</i> (2017) May;19(5):530-541.
4)	<u>†Maruyama T</u> (†:equally contributed), †Saitoh S, Yako Y, Kajita M, Fujioka Y, Ohba Y, Kasai N, Sugama N, Kon S, Ishikawa S, Hayashi T, Yamazaki T, Tada M and Fujita Y Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. <i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> (2017) 114(12):E2327-E2336
5)	Kadeer A, <u>Maruyama T</u> , Kajita M, Morita T, Sasaki A, Ohoka A, Ishikawa S, Ikegawa M, Shimada T and Fujita Y Plectin is a novel regulator for apical extrusion of RasV12-transformed cells. <i>Sci Rep.</i> (2017) 10(7):44328

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) 丸山 剛「光照射によるがん変異細胞の誘導と挙動解析」
第 42 回日本分生生物学会 (福岡) 2019 年 12 月
- 2) 丸山 剛「上皮細胞によるがん変異細胞の排除」
定量生命科学研究所シンポジウム (東京) 2019 年 8 月
- 3) 丸山 剛「細胞競合によるがん変異細胞の排除促進; がんの予防的治療を目指して」
日本医学会連合 Rising Star リトリート (千葉) 2019 年 3 月
- 4) Takeshi Maruyama Epithelia cell-cell communication via antigen presentation
Organoid 2019 (沖縄) 2019 年 4 月
- 5) 丸山 剛「細胞競合によるがん変異細胞の排除効率促進; がんの予防的治療を目指して」
癌研セミナー (東京) 2019 年 1 月 21 日
- 6) 丸山 剛、藤田恭之「がんの予防的治療を目指した哺乳類細胞競合 促進化合物の探索」
第 91 回日本生化学会 (京都) 2018 年 9 月 24 日
- 7) 丸山 剛、藤田 恭之「上皮細胞層における哺乳類細胞競合現象の観察方法」
実験医学 36(4): 93-101 (2018)