

平成30年7月6日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

**CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた
白血病細胞への分子標的療法剤に対する耐性遺伝子変異の導入
—新規治療薬を開発するためのモデル細胞系の樹立方法の確立—**

山梨大学医学部小児科学講座の玉井望雅と犬飼岳史准教授らの研究グループは、筑波大学および大阪大学との共同研究で、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて白血病細胞株に薬剤耐性の遺伝子変異を導入することに世界で初めて成功しました。本研究の成果は、Nature 出版の電子ジャーナルである Scientific Reports に、7月2日付けでオンライン掲載されました。掲載 URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-27767-6>

論文

掲載誌： Scientific Reports

掲載日時： 平成30年7月2日

論文タイトル： T315I mutation of BCR-ABL1 into human Philadelphia chromosome-positive leukemia cell lines by homologous recombination using the CRISPR/Cas9 system

著者： Minoru Tmamai¹, Takeshi Inukai¹, Satoru Kojika¹, Masako Abe¹, Keiko Kagami¹,
Daisuke Harama¹, Tamao Shinohara¹, Atsushi Watanabe¹, Hiroko Oshiro¹, Koshi Akahane¹,
Kumiko Goi¹, Eiji Sugihara², Shinichiro Nakada³, Kanji Sugita¹

1. 山梨大学医学部小児科学講座
2. 筑波大学プレジジョン・メディスン開発研究センター
3. 大阪大学大学院医学系研究科細胞応答制御学

はじめに

白血病をはじめとする様々ながんにおいて、種々の分子標的療法剤が開発されて治療効果が期待できるようになりました。分子標的療法剤は、がん細胞において活性化されている分子に対して特異的に効果を発揮する薬剤であり、従来の化学療法剤に比較して高い有効性と安全性が期待できます。しかし、治療中に分子標的療法剤の効果が低下して疾患が増悪・再発することが経験されます。そのような場合には、が

ん細胞の標的分子の遺伝子に高い頻度で変異が起きています。その結果、標的分子の特定のアミノ酸が別のアミノ酸へと置き換わることで分子標的療法剤の標的分子への結合が阻害されて、がん細胞が薬剤耐性を獲得します。この病態を克服するためには、標的分子に遺伝子変異を持つモデル細胞を樹立して、そのモデル細胞系を用いて機能的な解析を進め有効な薬剤を選別していくことになります。これまで、モデル細胞を樹立する方法としては、変異のある標的分子を発現ベクターによって遺伝子導入するのが一般的でした。しかし、この方法だと細胞が本来持っている標的分子に上乗せする形で変異型の標的分子が発現される点が問題とされてきました。理想的なモデル細胞系としては、細胞が本来持っている標的分子の遺伝情報を変異型の遺伝情報に置き換えることが求められます。

背景

私たちは、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、白血病細胞における標的分子の遺伝情報を変異型の遺伝情報へと置き換えることを試みました。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術は、2012 年に発表された革新的な技術です。CRISPR/Cas9 は、編集したい特定の DNA 配列へと正確に導く案内役である CRISPR と、DNA を切断する「ハサミ」の機能を持つ酵素である Cas9 タンパクの 2 つの構成成分から成ります。CRISPR/Cas9 によって切断された DNA は、通常は細胞が持つ DNA の修復機構によって応急的に繋ぎ合わされますが、その際に本来の DNA 配列にはない塩基が挿入されたり、逆に本来あるべき塩基が失われたりします。その結果、DNA の塩基配列に変化を生じて遺伝子の機能が失われます。一方、CRISPR/Cas9 に加えて、修復の「お手本」となるべき塩基配列情報を含む一本鎖 DNA を細胞に同時に導入すると、切断された DNA の修復が「お手本」の一本鎖 DNA の塩基配列との組み換えによって行われます（相同組み換えと言います）。私たちは、白血病細胞の標的分子の遺伝情報を、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で変異型の遺伝情報へと置き換える相同組み換えを試みました。しかし、成功させるためには重要な課題があることが分かりました。それは、白血病細胞を含むがん細胞では、しばしば相同組み換えを行うのに必要な DNA 修復に関わる仕組みが正しく機能しなくなっているという問題でした。その場合、CRISPR/Cas9 による DNA 切断部位は、「お手本」の一本鎖 DNA があっても応急的な繋ぎ合わせによって修復されてしまいます。

この問題点を克服するために、私たちは相同組み換えするための DNA 修復機構が維持されているかどうかを、PARP 阻害剤に対する耐性を指標にして評価しました。PARP は損傷した DNA の修復を助ける酵素です。PARP 阻害剤でその機能が抑制されても、他の DNA 修復機能が機能していれば損傷 DNA が修復されて細胞は生き残ることができます。一方、がん細胞において DNA 修復機能が損なわれていると PARP 阻害剤によって細胞死が誘導されます。PARP 阻害剤は、DNA 修復に寄与する BRCA1 遺伝子に変異を持つ乳癌に対する治療薬として、臨床応用もされています。そこで、白血病細胞株の PARP 阻害剤に対する感受性を解析したところ、多くの細胞株では細胞死の誘導が観察されましたが、一部の細胞株は耐性を示しました。そこで、私たちは PARP 阻害剤に耐性を示した白血病細胞株を対象にして、以下のような遺伝子変異の導入を試みて成功させることができました。

方法と結果

分子標的療法剤として最初に大きな成功を収めたのは、慢性骨髄性白血病に対するイマチニブです。慢性骨髄性白血病では、9 番染色体上にある ABL1 遺伝子と 22 番染色体上の BCR 遺伝子が結合したフィラデルフィア染色体によって形成された BCR-ABL1 融合遺伝子の産物によって、細胞の恒常的な増殖がも

たらされています。BCR-ABL1 は、細胞内のシグナル伝達に関わる分子のチロシンを、ATP (アデノシン三リン酸) のエネルギーを使ってリン酸化する酵素 (チロシンキナーゼ) 活性を持ちます。イマチニブは、BCR-ABL1 が ATP と結合するポケット構造に ATP と競合して結合することで、BCR-ABL1 の酵素活性を阻害して治療効果を発揮するチロシンキナーゼ阻害薬です。イマチニブの開発によって、慢性骨髄性白血病の治療成績は劇的に向上しました。しかし、イマチニブ治療中にその治療効果が低下した患者さんの白血病細胞では、しばしば BCR-ABL1 遺伝子に変異が検出されます。中でも ATP 結合ポケットを構成するアミノ酸の 1 つである 315 番目のアミノ酸が、スレオニンからイソロイシンへと置換される変異(T315I 変異)を獲得した場合には、イマチニブを改良させた第二世代のチロシンキナーゼ阻害薬 (ニロチニブ、ダサチニブ) に対しても強い耐性を示します。T315I 変異では、スレオニンをコードする塩基配列 (コドン) である ACT が、イソロイシンをコードする ATT へと 1 塩基が置き換わったことで BCR-ABL1 の ATP 結合ポケットの構造が変化して、ATP との結合は維持されるもののチロシンキナーゼ阻害薬と結合ができなくなって耐性を生じます。

そこで私たちは、CRISPR/Cas9 を用いた相同組み換えによって T315I 変異を導入してイマチニブ耐性を誘導することを試みました。対象は、慢性骨髄性白血病から樹立された 3 種類の白血病細胞株(K562 株、TCCS 株、KOPM28 株)で、いずれも前述の PRAP 阻害剤に耐性を示した細胞株です。これら 3 細胞株には T315I 変異はなく、いずれの株もイマチニブに感受性を示します。BCR-ABL1 遺伝子において 315 番目のコドンの近傍を特異的に認識して切断する CRISPR/Cas9 を設計し、315 番目のコドンの塩基配列を ACT から ATT へと置き換えた一本鎖 DNA を合成しました。合成した一本鎖 DNA には、自然発生した T315I 変異と区別するためと CRISPR/Cas9 による再切断を防ぐために、T315I 変異以外にコードされるアミノ酸情報に影響を及ぼさない 3 カ所の塩基に変異を追加しました (図 1 上段)。3 種類の白血病細胞株に、CRISPR/Cas9 と変異情報を含む一本鎖 DNA とを電気ショックによって導入して 5 日目から培養液にイマチニブを添加して培養し、1 から 3 週間後にイマチニブ耐性を獲得して増えてきた細胞の遺伝情報を調べました。その結果、いずれも BCR-ABL1 遺伝子に T315I 変異を含む 4 カ所の変異が認められ、相同組み換えによって T315I 変異が導入されたことが確認されました (図 1 下段)。実際に得られた細胞は、イマチニブ以外にもニロチニブやダサチニブにも強い耐性を示した一方で、T315I 変異を獲得した BCR-ABL1 にも効果があるポナチニブには感受性を示しました (図 2)。

まとめ

T315I 変異のモデル細胞系としては、マウスの造血因子依存性リンパ系細胞株において、T315I 変異を持つ BCR-ABL1 遺伝子を発現ベクターで導入した細胞系と、ヒトの慢性骨髄性白血病から樹立された白血病細胞株において、培養液に添加するイマチニブの濃度を徐々に上げながら数ヶ月をかけて培養することで誘導したイマチニブ耐性細胞の、2 種類が解析に用いられてきました (図 3 上段)。しかし、前者はマウスの細胞に発現ベクターで遺伝子導入した人工的な細胞系であり、後者は樹立するまでに長期間を要することと T315I 以外の耐性機序も一緒に誘導されている可能性が高いことが問題点でした。私たちは、こうした従来のモデル細胞系の限界と欠点を克服して、がん細胞に分子標的療法剤に対する耐性変異の遺伝情報を導入する技術基盤を確立することに成功しました (図 3 下段)。この方法を応用することで、多様ながんに対する種々の分子標的療法剤における耐性変異の機能的な影響を正しく評価し、その耐性を克服する新規治療薬の開発へと発展させること可能になると期待されます。

要点

- PARP 阻害剤に対して耐性を示すことが、がん細胞株において CRISPR/Cas9 による相同組み換えが成功する指標となる可能性が示唆されました。
- CRISPR/Cas9 による相同組み換え技術によって、慢性骨髄性白血病に特異的な分子標的療法剤である イマチニブに対する耐性獲得の代表的な機序である T315I 変異を、白血病細胞株の BCR-ABL1 遺伝子に導入する事に成功しました。
- 本技術によって、従来の方法に比べて極めて短時間で T315I 変異細胞を樹立することができました。
- 本技術は、がんに対する分子標的療法剤の耐性を克服するためのモデル細胞系の樹立を容易にして、新たな治療薬の開発に貢献することが期待されます。

用語解説

細胞株：培養容器の中で一定の性質を維持しながら安定的に増殖できる状態になった細胞

発現ベクター：目的の遺伝子を細胞内に発現させるために用いられる輸送の役目を果す環状 DNA

慢性骨髄性白血病：フィラデルフィア染色体を持つ比較的緩徐に進行する白血病で、無治療の場合は3年程度で急性白血病へと変化して致命的となる

シグナル伝達：細胞内で生じる一連の反応で、分子から分子にシグナル（信号）が伝播していく現象

ATP：アデノシンに3つのリン酸基が結合した生体のエネルギー源

コドン：タンパクのアミノ酸配列に関する遺伝情報で各アミノ酸に対応する3つの塩基配列

造血因子依存性リンパ系細胞株：造血因子のインターロイキン3を培養液に添加した条件で増殖するマウス由来のリンパ球系統の細胞株

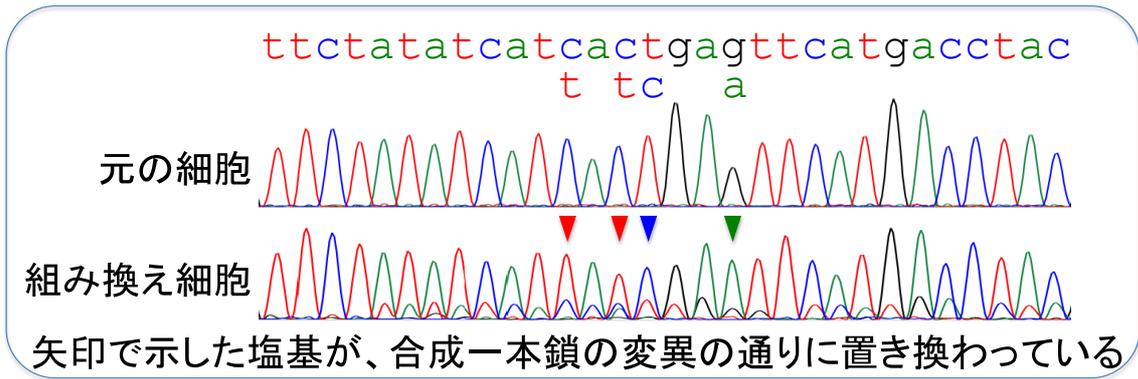


図1. CRISPR/Cas9の設計図と樹立した細胞の獲得した遺伝子変異

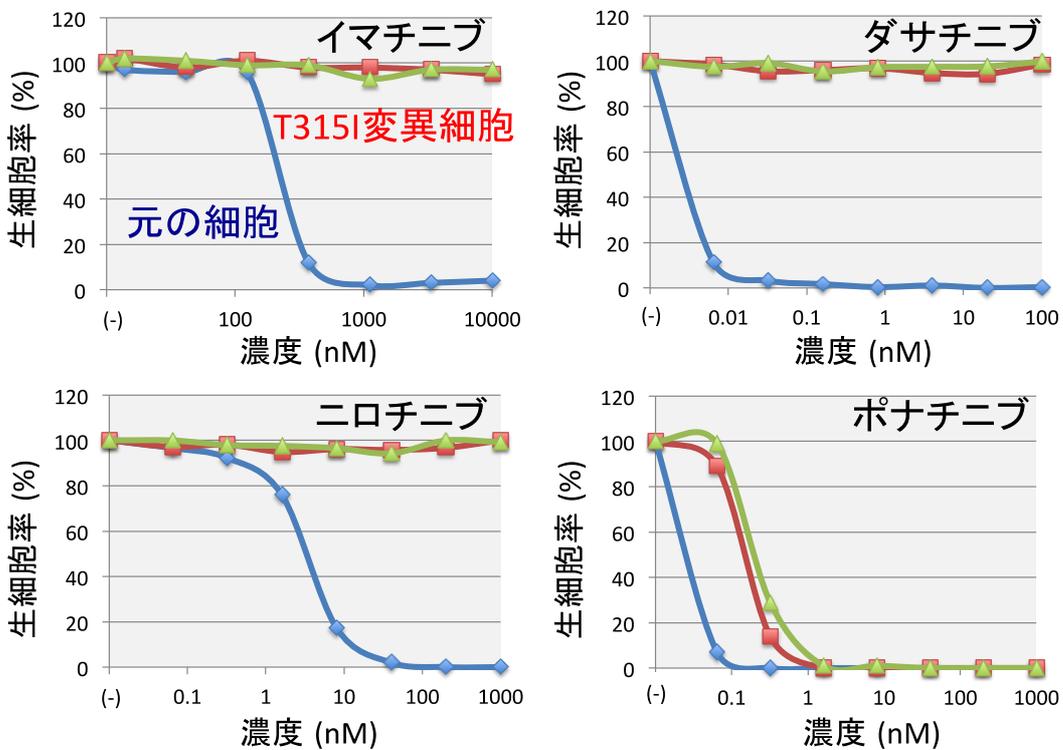


図2. 樹立した細胞のチロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性

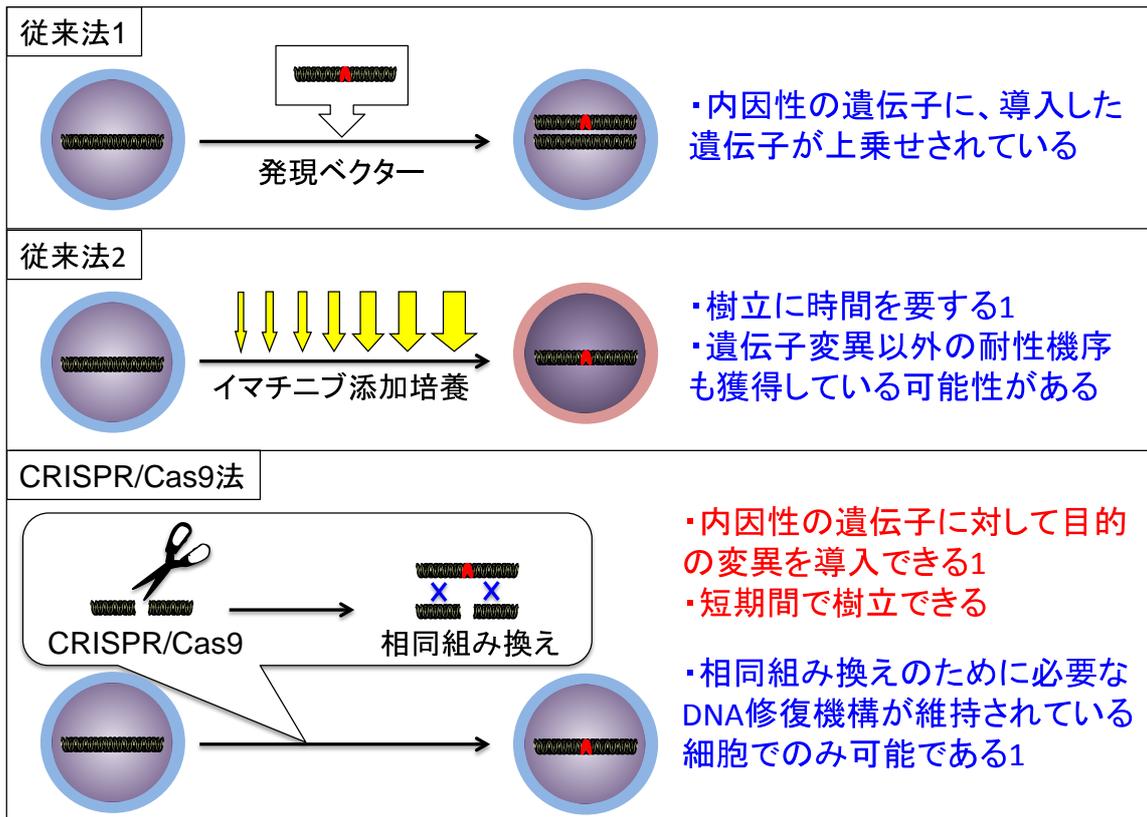


図3.1.ゲノム編集技術による変異遺伝子の導入法と従来法との比較

お問い合わせ先

- 研究に関する事
 - 山梨大学医学部小児科学講座 准教授
 - 犬飼岳史 (いぬかいたけし)
 - E-mail: tinukai@yamanashi.ac.jp

- 広報に関する事
 - 山梨大学総務部総務課広報企画室
 - TEL: 055-220-8006 E-mail: koho@yamanashi.ac.jp