

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的がん医療実用化研究事業

(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名：(日本語) 安全なゲノム編集システムの開発とがん免疫療法への応用

(英語) Secure System of Genome Editing and Application to Cancer Immunotherapy

研究開発担当者 (日本語) 石坂幸人

所属 役職 氏名：(英語) National Center for Global Health and Medicine, Director,
Dept. of Intractable Diseases, Yukihiro Ishizaka

実施期間：平成28年11月28日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) pTALE 作製

(英語) Design and preparation of pTALE

研究開発分担者 (日本語) 広島大学大学院理学研究科・特任講師・佐久間 哲史

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Science, Hiroshima University・Lecturer
(Special Appointment)・Tetsushi Sakuma

分担研究課題名：(日本語) 安全なゲノム編集システムの開発とがん免疫療法への応用

(英語) Secure System of Genome Editing and Application to Cancer Immunotherapy

研究開発分担者 (日本語) 志村まり

所属 役職 氏名：(英語) Chief, Section of Intractable Diseases, Dept. of Intractable Diseases,
Research Institute, National Center for Global Health and Medicine,
Mari Shimura

分担研究課題名：（日本語）安全なゲノム編集システムの開発とがん免疫療法への応用
（英 語）Sequire System of Genome Editing and Application to Cancer
Immunotherapy

研究開発分担者 （日本語）国立国際医療研究センター・部長 鈴木春巳

所属 役職 氏名：（英 語）National Center for Global Health and Medicine, Director,
Dept of Immunolgy and Pathology

II. 成果の概要（総括研究報告）

1) エピゲノム変化誘導による遺伝子発現抑制（石坂、志村、佐久間）

まず、研究代表者が同定してペプチドベクター（NTP:nuclear trafficking peptide）のヒト健康人末梢血由来単核球細胞(PNMC)に対する作用を検証した。最終濃度 10 μM の NTP-EGFP 蛋白質を培養中の PBMC に添加したところ、約 60% の細胞が EGFP 陽性を示したのに対し、EGFP 投与群では陽性細胞の有意な増加を認めなかった。また、CD8 陽性細胞のほぼ全ての細胞が標的遺伝子発現が陽性であることが分かった。

そこで、今年度の標的遺伝子として設定した遺伝子のプロモーター領域の塩基配列情報をもとに、三種類のゲノムモジュレーターを作製し、それぞれの 3' 側にエピゲノム変化を示す修飾酵素を結合させた。コムギ胚芽無細胞蛋白質発現システムで蛋白質を発現し、精製後の蛋白質を HeLa 細胞に添加し、機能性を評価した。

2) C/T 変異誘導による遺伝子破壊法開発（石坂）

シトシンデアミナーゼ活性を示す APOPBEC の作用により、C から T への変異誘導を試みた。APOBEC の機能ドメインに NTP-TALE を付与した組み換え蛋白質を大腸菌で発現させ、精製した。これを付着培養細胞に作用させた後、標的遺伝子産物の発現を解析したところ、内在性遺伝子産物の発現を抑制できないことが分かった。

3) 遺伝子改変 CTL の細胞障害性機能（鈴木、石坂）

ヒト細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の機能評価を行うために、まずは評価系の構築を行った。標的細胞は HLA-A2 を発現する T2 細胞（腫瘍細胞）を理研細胞材料開発室より購入した。ヒト CTL に関しては、インフォームドコンセントの後、当センター医師の協力のもとボランティアから採血し、HLA-A2 アレルを保有することを確認した者の末梢血より単核球の分離を行い、腫瘍抗原反応的 T リンパ球の樹立を開始した。さらに、CTL と同じヒト由来の制御性 T リンパ球 (Treg) を用いて共培養し、腫瘍細胞への細胞傷害性が抑制される可能性についても検証した。

a. Development of genome modulators and application to cancer immunotherapy

Recent progress of cancer immunotherapy suggests that blocking of immune checkpoint controls can enhance anti-tumor activity of cytotoxic T cells (CTL). However, it is also reported that regulatory T cells (Treg) inhibits the CTL activity, implying that for more efficient cancer immunotherapy, both immune checkpoint controls and Treg function should be blocked. Our current project is to establish a system that can manipulate CTLs resistant to both immune checkpoint controls and Treg function without viral vectors or transfection procedures. Principle investigator developed a novel cell penetrating peptide that is superior to reported peptides such as tat-derived peptide or R11. Notably, proteins or nanoparticles examined, when tagged with the peptide and added to the culture medium of cells, can enter into nucleus. This is because we named the peptide NTP (nuclear trafficking peptide). Here, we are preparing NTP-tagged genome modulators that can block Treg function just by culturing CTLs in the presence of the molecules.

In 2016, we first confirmed that NTP-tagged EGFP can enter into more than 50% of peripheral blood mononuclear cells, and identified several candidate genome modulators that could efficiently reduce mRNA expression of target molecules. We are now preparing recombinant proteins, and applying them to T lymphocytes to test whether endogenous expression of target molecules is blocked.

b. Development for gene editing system from C to T

APOBEC(polipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like) induces C to T mutation, and can be used as a genome-editing molecule by inducing stop codon by changing CAA to TAA. We here tested NTP-tagged APOBEC can insert stop codon in target gene. NTP-TALE-conjugated APOBEC protein was expressed in bacteria and purified to an apparent single band. Purified protein was added to the culture medium of HeLa cells, and checked whether protein expression of endogenous target molecule was reduced. Unfortunately, we could not obtain positive results.

c. Evaluation of cytotoxic function of gene-modified CTL

Prior to the analysis of gene-modified CTLs, we first established the assay system for evaluating function of human CTL. The HLA-A2 expressing-target tumor cell, T2 was purchased from RIKEN, and for human CTLs, we obtained peripheral blood from HLA-A2-positive healthy volunteers. We are establishing tumor Ag-specific CTLs against HLA-A2-restricted NY-ESO-1 peptide (SLLMWITQC) by using previously published protocol (JEM, v199, p1503, 2004). Currently, we are evaluating inhibitory effect of Tregs obtained from the same volunteer with this CTL/T2-pep target system. Now, we are almost ready for evaluating gene-modified CTLs.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌8件）

1. Shimura M, Shindou H, Szyrwiel L, Tokuoka SM, Hamano F, Matsuyama S, Okamoto M, Matsunaga A, Kita Y, Ishizaka Y, Yamauchi K, Kohmura Y, Lobinski R, Shimizu I, Shimizu T. Imaging of intracellular fatty acids by scanning X-ray fluorescence microscopy. *FASEB J*, 30(12):4149-4158, 2016.
2. Ueno M, Okamura T, Mishina M, Ishizaka Y. Modulation of long interspersed nuclear element-1 in the mouse hippocampus during maturation. *Mob. Genet. Elem.*, 6(4):e121198, 2016.
3. Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H, Hiroshi Sakagami. Morphine and Fentanyl Citrate Induce Retrotransposition of Long Interspersed Element-1. *In vivo*, 30(2):113-8, 2016.
4. Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics*. 2016, 17, 979.
5. Tochio N, Umehara K, Uewaki JI, Flechsig H, Kondo M, Dewa T, Sakuma T, Yamamoto T, Saitoh T, Togashi Y, Tate SI. Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy. *Scientific Reports*. 2016, 6, 37887.
6. Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes to Cells*. 2016, 21, 1253-1262.
7. Nakagawa Y, Sakuma T, Nishimichi N, Yokosaki Y, Yanaka N, Takeo T, Nakagata N, Yamamoto T. Ultra-superovulation for the CRISPR-Cas9-mediated production of gene-knockout, single-amino-acid-substituted, and floxed mice. *Biology Open*. 2016, 5, 1142-1148.
8. Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 2016, 19, 127-138.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫県淡路市夢舞台、“HIV-1 Vpr induces DNA damage and DNA damage response by changing DNA structure”
2. 日本放射線影響学会第59回大会、広島県広島市中区加古町、“HIV-1 VprによるDNA二重鎖切断誘導機構”

3. 茨城大学理学部公開シンポジウム 第 10 回 Quantum Medicine 研究会、茨城県水戸市文京、“ウイルス感染と DNA 損傷の相互作用”
4. 松永章弘、岡雅子、石坂幸人、志村まり, A subgroup of HIV-patients shows a DNA methylation profile similar to HIV-associated lymphoma, 第 75 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜、10 月, 2016.
5. 松永章弘、岡雅子、柳川泰昭、梅野富輝、今留健一、潟永博之、岡慎一、萩原槩太郎、石坂幸人、志村まり, HIV 感染者末梢血 DNA のメチル化変動を指標とした HIV 悪性リンパ腫早期診断の可能性, 第 18 回白馬シンポジウム小淵沢、10 月, 2016.
6. 松永章弘、吉田壘、豊岡理人、村田行則、石坂幸人、田中紀子、萩原槩太郎、志村まり, DNA メチル化分布変化による B 細胞性リンパ腫の予後予測, 第 39 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、11 月, 2016
7. 上野 美華子, 石坂 幸人. Unidentified functions of the genome: Retrotransposition of L1 in hippocampus influenced by environmental stress, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム, パシフィコ横浜, 11 月, 2016.
8. 上野 美華子, 岡村 匡史, 石坂 幸人. マウス発達期の海馬におけるレトロトランスポゾン long interspersed nuclear element-1 (L1)の動態調節. 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 11 月, 2016.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特記すべき事無し.

(4) 特許出願
特記すべき事無し.