

平成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) 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  
(英語) Development and application of vectors for epigenome editing that multiply regulate the expression of cancer-related genes
- 研究開発担当者 (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
- 実施期間： 平成28年11月28日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) エピゲノム編集ベクターの作製  
開発課題名： (英語) Construction of vectors for epigenome editing
- 研究開発分担者 (日本語) 広島大学大学院 理学研究科・教授・山本 卓  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Hiroshima University・Professor・Takashi Yamamoto
- 分担研究 (日本語) エピゲノム情報の解析  
開発課題名： (英語) Analysis of epigenome information
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野・分野長・牛島 俊和  
所属 役職 氏名： (英語) Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute・Chief・Toshikazu Ushijima
- 分担研究 (日本語) 癌細胞へのベクターの導入と機能性評価  
開発課題名： (英語) Introduction of vectors into cancer cells and their functional validation

研究開発分担者 (日本語) 川崎医科大学 総合外科学教室・准教授・深澤 拓也  
所属 役職 氏名: (英語) Kawasaki Medical School, Department of General Surgery,  
Associate Professor, Takuya Fukazawa

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、エピゲノム編集技術を用いた癌治療用ベクターを開発することを目的とし、エピゲノム編集技術の高度化・多重化に向けたベクター開発、およびエピゲノム編集ベクターの癌細胞への導入と機能性評価を実施している。

前者については、従来のエピゲノム編集システムを拡張させた第三世代システムとして、多段階のタグを介在し、様々なエフェクタータンパク質を任意のゲノム領域に呼び込むことのできるマルチタスク型ベクターシステムを構築した。またその機能性を実証するため、主として癌抑制遺伝子である *CDH1* 遺伝子の活性化を指標としてヒト細胞での評価を実施した。その結果、従来の第一世代システム (dCas9-VP64) や第二世代システム (dCas9-VP64+MS2-p65-HSF1; SAM システム) と比して、本研究で構築した第三世代システムが特に優位な転写活性化効果を示した。更に第二世代の SAM システムでは転写活性化効果が全く見られなかった *RANKL* 遺伝子座においても、本研究で確立した第三世代システムを用いることで顕著な転写の活性化が認められ、本システムの優位性が遺伝子座特異的ではないことが明らかとなった。

後者については、臨床応用のためのベクター開発として、肺扁平上皮癌における系統維持型癌遺伝子である *Sox2* および *p63* 遺伝子を標的とし、本年度はまずプロトタイプ的第一世代ベクター (ただしゲノム上の複数箇所を同時に標的とする all-in-one multiplex vector を使用) による実証実験を行った。プラスミドベクターの導入により、各遺伝子の発現が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで顕著に減少することが確認できただけでなく、アデノウイルスベクターを用いた発現抑制効果も実証した。更に、Annexin V を用いた Flowcytometry 解析および TUNEL 染色によって、アポトーシス誘導効果も実証され、癌抑制ベクターとしての有効性が示された。

In this study, we have been developing the vector system for highly multiplexed epigenome editing and applying and validating them in cancer cells, to establish the vector for the cancer therapy by epigenome editing.

First, we constructed the multi-tasking vector system that enables to recruit various effector proteins at the desired genomic region via multiple tags as the third-generation epigenome editing system. In addition, to demonstrate its functionality, we evaluated the vector by transcriptional activation mainly at the *CDH1* gene locus, known as a tumor-suppressor gene, in human cells. Compared to the first-generation (dCas9-VP64) and the second-generation (dCas9-VP64 with MS2-p65-HSF1; SAM) systems, our third-generation system constructed in this study showed particularly superior effect of transcriptional activation. Moreover, the second-generation SAM

system could not activate the transcription of *RANKL* gene, but our third-generation system could significantly activate the transcription at the *RANKL* locus. Thus, the superiority of our system in activating endogenous genes was proven to be locus independent.

Second, as the vector development for clinical application, we have conducted a proof-of-concept study by using the first-generation prototype vector (all-in-one vector for multiplex epigenome editing), targeting *Sox2* and *p63* genes, which are known as the lineage-specific oncogenes of squamous cell lung cancer. By introducing plasmid vectors, we observed significant decrease of expression of each gene at both mRNA and protein level. In addition, the inhibition of expression was also observed by introducing adenoviral vectors. Moreover, the effect of apoptosis induction was demonstrated with flowcytometry analysis using Annexin V and TUNEL staining. Thus, the effectiveness of our vector for cancer repression was demonstrated.

### 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 6 件)

1. 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.
2. Sasakura Y, Ogura Y, Treen N, Yokomori R, Park SJ, Nakai K, Saiga H, Sakuma T, Yamamoto T, Fujiwara S, Yoshida K. Transcriptional regulation of a horizontally transferred gene from bacterium to chordate. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2016, 283 (1845).
3. Yoshida K, Hozumi A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Shirae-Kurabayashi M, Sasakura Y. Germ cell regeneration-mediated, enhanced mutagenesis in the ascidian *Ciona intestinalis* reveals flexible germ cell formation from different somatic cells. Developmental Biology. 2017, 423, 111-125.
4. Yoshida K, Nakahata A, Treen N, Sakuma T, Yamamoto T, Sasakura Y. Hox-mediated endodermal identity patterns pharyngeal muscle formation in the chordate pharynx. Development. 2017, 144, 1629-1634.
5. Takayama K, Igai K, Hagihara Y, Hashimoto R, Hanawa M, Sakuma T, Tachibana M, Sakurai F, Yamamoto T, Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. Nucleic Acids Research. 2017, in press.
6. Guo M, Tomoshige K, Meister M, Muley T, Fukazawa T, Tsuchiya T, Karns R, Warth A, Fink-Baldauf IM, Nagayasu T, Naomoto Y, Xu Y, Mall MA, Maeda Y. Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. EMBO Molecular Medicine. 2017, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Advanced method to generate gene cassette knock-in and floxed mice using the PITCh system facilitated with MMEJ enhancer, ポスター, Tetsushi Sakuma, Tomomi Aida, Shota Nakade, Takashi Yamamoto, Kohichi Tanaka, Keystone Symposia - Precision Genome Engineering, 2017/1/8-12, 国外.
2. Highly practical gene knock-in in mammalian cells and zygotes with MMEJ-dependent strategy, 口頭, Tetsushi Sakuma, 2nd Annual Genome Editing & Engineering Conference, 2017/2/6-7, 国外.
3. Recent Development and Application of Genome Editing Tools and Methods, 口頭, Tetsushi Sakuma, The 20th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference - CRISPR/Cas9 Gene Editing In Vivo, 2017/3/9, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし