

平成31年6月14日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 341

氏名 小倉 治一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：メモリアルスローンケタリングがんセンター（国名：アメリカ合衆国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集による Ewing 肉腫人工転座遺伝子作製と機能解析3. 派遣期間：平成29年5月31日 ～ 平成31年5月30日

4. 受入機関名及び部局名

メモリアルスローンケタリングがんセンター、Marc Ladanyi, MD5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4判相当3ページ以上、英語で記入も可）**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1～4に記入の上、併せて提出すること。

研究・調査実施状況

研究目的

- 1) Ewing 肉腫のドライバー遺伝子である *EWS-FLI1* 融合遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いてヒト間葉系幹細胞 (hMSC) に導入し、同一個体から誘導された内在性の融合遺伝子を有した Ewing 肉腫細胞株を作製し、コントロール細胞株の発現プロファイルを比較・検討することで、Ewing 肉腫における病態解明と治療標的の同定を行う。
- 2) Ewing 肉腫において予後と関連する二次変異である *STAG2* の機能喪失型変異を有する細胞株を CRISPR/Cas9 を用いて作製し、コントロール細胞株の発現プロファイルを比較・検討することで、Ewing 肉腫における病態解明と治療標的の同定を行う。

研究方法

1. CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による Ewing 肉腫人工転座遺伝子の作製

Ewing 肉腫において、*EWS-FLI1* 融合遺伝子産物が与える下流遺伝子発現への影響をより正確に検討するために、*EWS-FLI1* 融合遺伝子を有する Ewing 肉腫細胞株を作成する。具体的には、Ewing 肉腫の発生起源

(cell of origin) であることが知られている hMSC において (Riggi N. Cancer Res, 2008)、*EWS-FLI1* 融合遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて導入し、*EWS-FLI1* 融合遺伝子を有する Ewing 肉腫細胞株を作製する。*EWS-FLI1* 融合遺伝子産物に依存した遺伝子発現の解析を行い、*EWS-FLI1* に制御される転写の全体像を解明する。

2. CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による STAG2 ノックアウト Ewing 肉腫細胞株の作製

さらに、Memorial Sloan Kettering Cancer Center が展開する大規模臨床シークエンスプログラムである MSK-IMPACT において、世界最大規模の骨軟部肉腫の症例数を背景として明らかになった Ewing 肉腫において予後と関連する二次変異である *STAG2* の機能喪失型変異 (R216X) の役割を検討するために、*STAG2* ノックアウト細胞株を CRISPR/Cas9 を用いて作製する。*EWS-FLI1* 融合遺伝子とこれらの二次変異の相互作用による細胞機能への影響を確認する。

3. Ewing 肉腫における新規治療標的の同定

上記 1 および 2 において、これまでにないアプローチで作製した細胞株で *in vitro* で薬剤スクリーニングおよび CRISPR スクリーニングを行い、有効な分子標的治療薬の候補を同定する。このスクリーニングの結果で上位の候補の薬剤については *in vivo* での検討を加える。

研究結果・考察

1. CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による Ewing 肉腫人工転座遺伝子の作製

Ewing 肉腫のドライバー遺伝子である *EWS-FLI1* 融合遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術と二本鎖切断 (DSB) 後の相同組換え型修復 (*HDR*) を用いて、を用いてヒト間葉系幹細胞 (hMSC) に導入し、同一個体から誘導された内在性の融合遺伝子を有した Ewing 肉腫細胞株を作製した (Spraggon L. J Pathol, 2017)。

現在、Ewing 肉腫の病態のより生理的な評価を行い、治療標的の同定を試みるべく、コントロール細胞株との比較のため、RNAseq を用いた発現解析、sWGS を用いたコピー数解析を行っている。

最新の CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた人工転座遺伝子を含めた疾患モデルの作製が肺癌における *CD74-ROS1*、*EML4-ALK* (Maddalo D. Nature 2014, Choi PS. Nat Commun 2014)、白血病における *RUNX1-ETO* (Torres R. Nat Commun 2014) で報告され、これらの疾患モデルを用いた病態解明などへの応用が始まりつつあるが、これまで骨軟部肉腫において人工転座作製について報告している先行研究はない。本研究では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて Ewing 肉腫における人工転座作製および *STAG2* ノックアウトを世界にさがけて試みた。

EWS-FLI1 融合遺伝子の機能解析については、ゼブラフィッシュにおいてヒト *EWS-FLI1* を強制発現させたトランスジェニックモデル (Leacock SW. Dis Model Mech 2012) やレンチウイルスを用いてヒト胚性幹細胞に *EWS-FLI1* を導入したモデル (Gordon DJ. Oncogene 2015) における機能解析は存在するが、いずれも外因性に遺伝子を導入した系での解析であり、Ewing 肉腫の病態を正確に反映しているとは言いがたい。本研究では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により内因性の遺伝子改変を行うものであり、Ewing 肉腫の病態のより生理的な評価が可能となり、これまでにない先進的かつ独創的な視点から Ewing 肉腫の病態のさらなる理解、治療開発に関する重要な知見が得られることが期待される。

2. CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術による STAG2 ノックアウト Ewing 肉腫細胞株の作製

Ewing 肉腫において予後と関連する二次変異である *STAG2* の機能喪失型変異の役割を検討するために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術と二本鎖切断 (DSB) 後の非相同性末端結合 (NHEJ) を用いて、Ewing 肉腫の代表的な細胞株である、CHP100、A673、TC71 において、*STAG2* ノックアウト細胞株を作製した (図 1)。ノックアウト細胞株についてはウエスタンブロットにて 2 つのゲノム編集後 (*STAG2* ノックアウト) 細胞

株 (CHP-18, CHP-30) では STAG2 の発現がないことを確認した (図 2A)。さらに、Sanger 法にて、ゲノム編集後に、indel formation があること (図 2B)、qRT-PCR では STAG2 ノックアウト細胞株 (CHP-18, CHP-30) で mRNA レベルで STAG2 の発現が著明に低下していること (図 2C) を確認した。

Isogenic cell の比較では増殖率に差はなかったものの、STAG2 ノックアウト細胞株では CHP100、A673、TC71 のいずれの細胞でも、浸潤性の強い形態をとることが明らかになった (unpublished data)。また、isogenic 細胞株を比較することで、STAG2 の細胞機能への影響を検討し、治療標的を同定することを目的として、RNA seq を用いた発現解析、ATAC seq を用いた Transposome による網羅的なオープンクロマチン領域の解析、ChIP seq を用いたクロマチン構造変化のエピジェネティックな修飾、天赦因子の結合部位の網羅的解析を行ったところ、遺伝子 X が STAG2 ノックアウト細胞において過剰発現していることを同定し、ATAC seq の結果をもとにしたモチーフ解析でも STAG2 および遺伝子 X の相互作用が示唆された。ChIP seq においては、STAG2 の状態による明らかな差異は同定できなかった (図 3)。

3. STAG2 変異 Ewing 肉腫における新規治療標的の同定

従来の化学療法への抵抗性を示す STAG2 変異 Ewing 肉腫における新規治療標的を同定すべく、次のようなアプローチを行った。

1. Isogenic cell を用いた CRISPR スクリーニング

メモリアルスローンケタリングがんセンターの Jollepalli Lab と共同研究のもと、*in vitro* で CRISPR/Cas9 を用いた網羅的合成致死スクリーニングを利用し、STAG2 ノックアウト細胞において、治療標的となる分子の同定を試みたところ、STAG1 をはじめとした、600 を超える合成致死の候補となる分子を同定した。

2. 薬剤スクリーニング

Selleck 社の Epigenetic drug library (Epigenetic drug library (316 種類の薬剤)、FDA-approved drug library Epigenetic drug library (2850 種類の薬剤) を用いて、*in vitro* で STAG2 ノックアウト細胞において有効な分子標的治療薬の候補を同定した。

上記 1, 2 のスクリーニングにおいて、STAG2 ノックアウト細胞に有効なパスウェイ、分子を同定し、現在、上位の候補の薬剤について、さらなる *in vitro* での検討を加えているところである。

今後、これらの検討が終わり次第、*in vivo* での検討を加える予定である。

3. STAG1 を標的とした治療開発 (図 4)

2017 年になってから、我々が注目している STAG2 がそのパラログである STAG1 と合成致死 (両方の遺伝子が機能しなくなるとがん細胞が死滅する) の関係にあることが報告された (van der Lelij P. Elife 2017)。これは我々の CRISPR スクリーニングでも同様の結果であった。すなわち、STAG2 変異により、STAG2 が不活化されている Ewing 肉腫においては、STAG1 が治療標的になることを意味する。

STAG1 をどのように治療標的にするかは難しい問題であるが、我々は次世代型アンチセンスオリゴ (ASO) を用いて標的とした。

ASO は核酸医薬として期待されている短鎖の一本鎖核酸である。mRNA の発現を低下させることで、標的遺伝子の発現を抑制する。現在の ASO の主流は gapmer type と呼ばれる ASO であり、これは、中心に 5-10 mer 程度の DNA を置き、その左右に 2-5 mer の Locked nucleic acids (LNA)、2'-O-methoxyethyl RNA (MOE)、constrainedethyl BNA (cEt) などの人工化学修飾核酸を配し、さらに全核酸間 phosphorothioate 修飾 (S 化) を加えた ASO である。左右の人工核酸により Nuclease 耐性と標的 mRNA との強固な結合力をもち、中央の DNA が標的 mRNA と DNA/RNA heteroduplex を形成し、この heteroduplex を RNaseH が認識して標的 mRNA が切断される。2011 年家族性高コレステロール血症に対

する核酸治療薬 Kynamro が FDA に承認され、がんの領域でも近年、KRAS や STAT3 を標的とした ASO が開発されている (Ross SJ. Sci Transl Med 2017, Hong D. Sci Transl Med 2015)。

実際、我々の研究室でも他の肉腫に対して、IONIS Pharmaceuticals 社との共同研究で Gapmer ASO を用いた核酸医薬の開発を行っており、*in vivo* でも一定の成果をあげつつある。我々は、すでに同社との共同研究契約を締結し、予後不良な一群である STAG2 変異により、STAG2 が不活化されている Ewing 肉腫に対して、STAG1 をターゲットとした合成致死を利用した新規治療薬の開発を開始した。

結論

1. CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて Ewing 肉腫における人工転座作製および STAG2 ノックアウトモデルを世界にさがけて作製した。
2. 現在、1 で作製した isogenic な細胞株の発現プロファイル等の比較、薬剤スクリーニング、CRISPR スクリーニングを行うことで、治療標的となる遺伝子 X を同定した。
3. 今後、*in vivo* での検討を行う予定である。

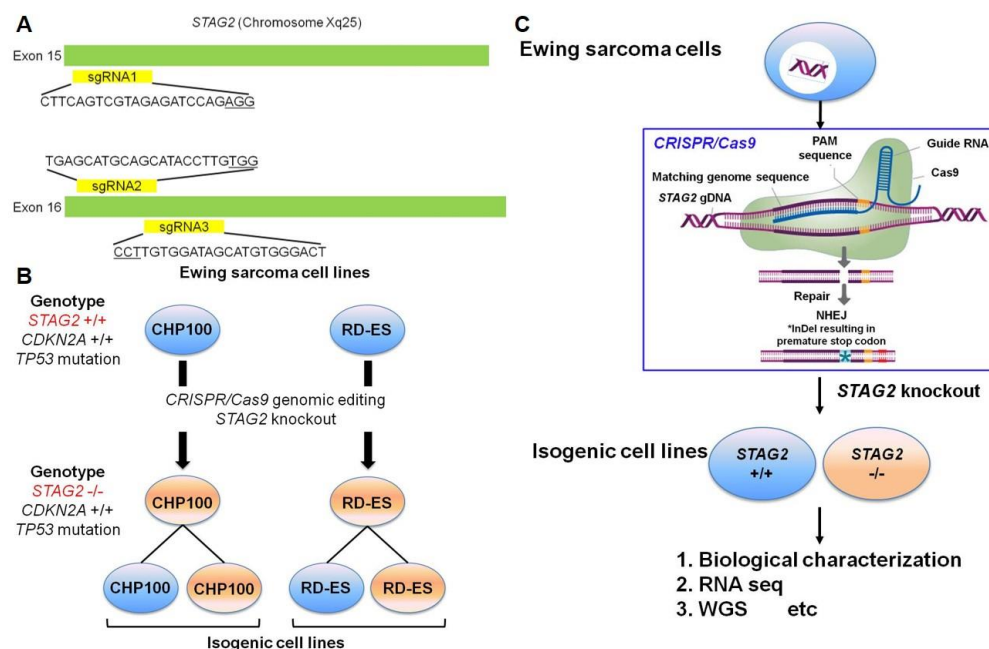


図 1. (A) STAG2ノックアウト細胞株を作製するために、Human Gecko v2 CRISPR reference libraryを用いて3つのsgRNAをデザインした。sgRNA1はSTAG2のexon 15、sgRNA2、sgRNA3はSTAG2のexon 16をターゲットとしている。PAM配列はアンダーラインで示す (-NGG)。(B) (C) Ewing肉腫細胞株(CHP100、RD-ES)における STAG2^{+/+} isogenic cellsの作製および解析のワークフローを示す。

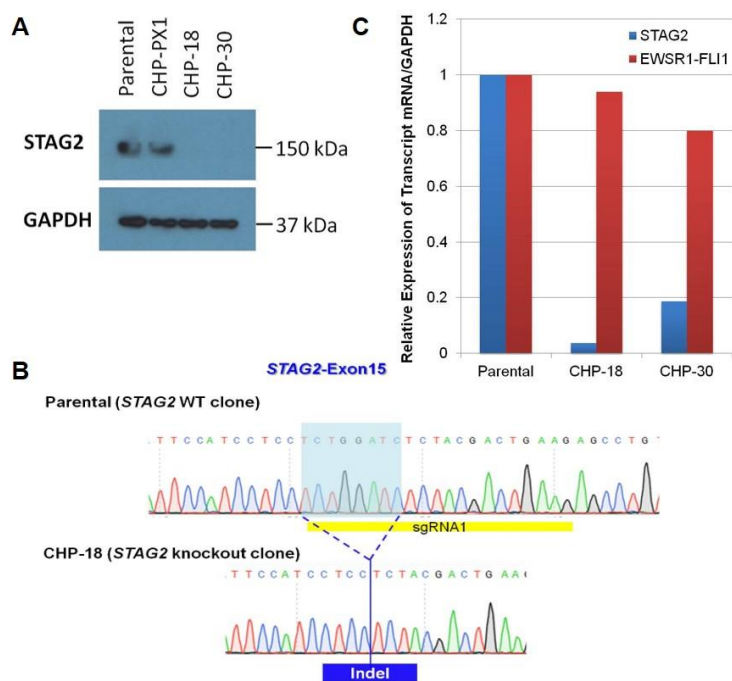


図 2. (A) ウェスタンブロットにてCHP100 (parental cell line)、コントロール細胞株 (CHP-PX1)ではSTAG2の発現があるのに対して、2つのゲノム編集後 (STAG2ノックアウト) 細胞株 (CHP-18, CHP-30) では発現がないことを確認した。(B) Sanger法にて、ゲノム編集後に、indel formationがあることを確認した。(C) qRT-PCRではSTAG2ノックアウト細胞株 (CHP-18, CHP-30) でmRNAレベルでSTAG2の発現が著明に低下している。

Preranked GSEA analysis was performed using Oncogenic signatures, Hallmark signatures and Curated signatures.

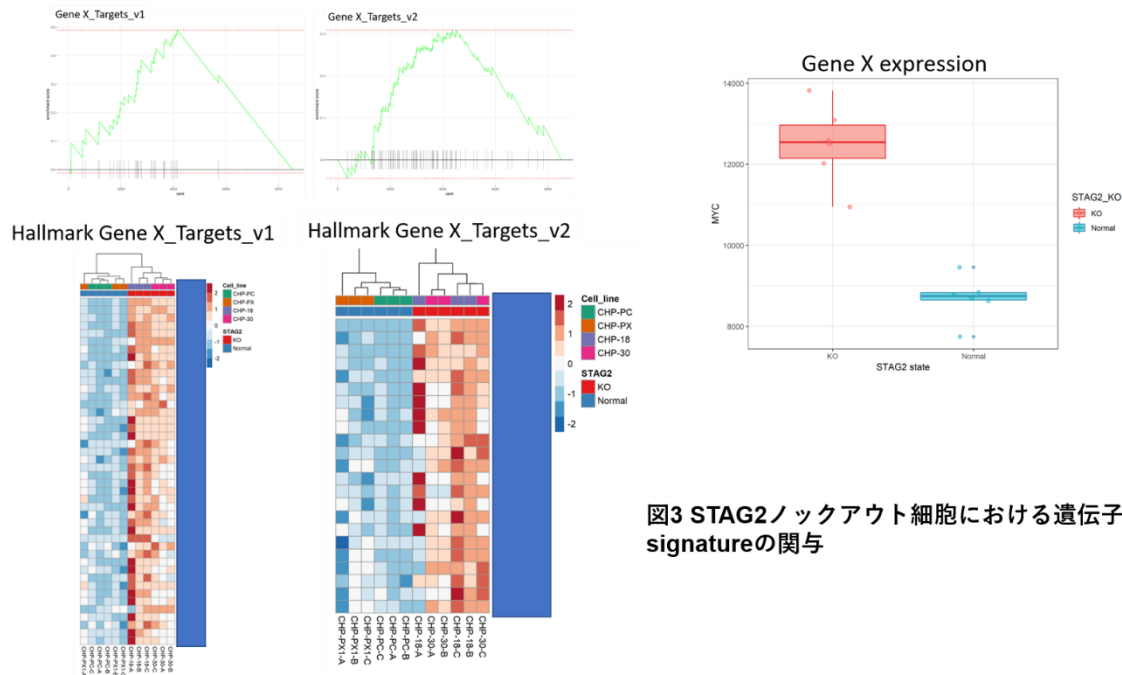


図3 STAG2ノックアウト細胞における遺伝子Xおよびそのsignatureの関与

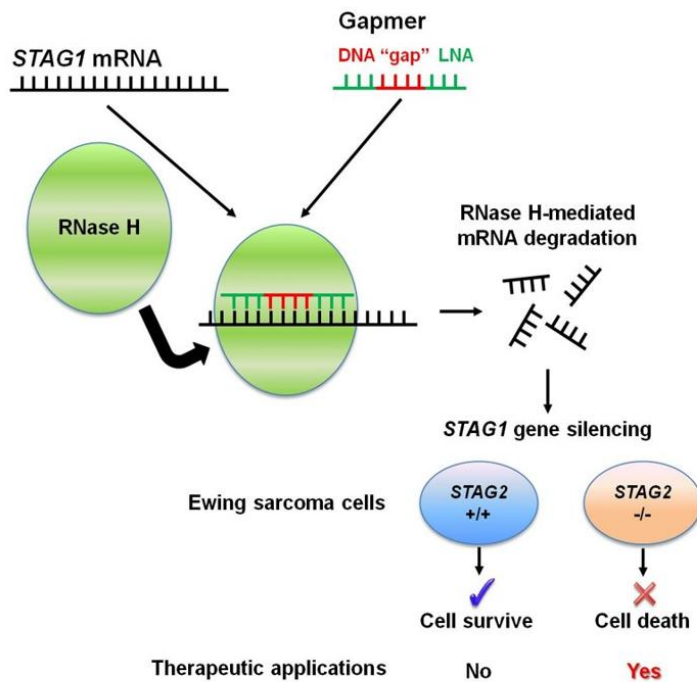


図4 シーマ: STAG2のEwing肉腫における合成致死を利用したGapmer ASOの治療への応用