

解禁日時:2021年8月24日(火)午後6時(日本時間)

## プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人  
東京医科歯科大学  
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

報道関係各位

2021年8月23日

国立大学法人東京医科歯科大学

### 「 $\beta$ -catenin活性化型肝がんの免疫回避機構を解明」 — 新規多重ゲノム編集技術を用いて内在性 $\beta$ -catenin活性化を実現 —

#### 【ポイント】

- *CTNNB1*( $\beta$ -catenin)活性化型変異は肝がんの約30%の症例で認められ、 $\beta$ -catenin活性化型肝がんの微小環境内では腫瘍免疫が抑制されていることが知られています。しかし、そのメカニズムは十分には解明されていません。
- 研究グループは、新規開発したCRISPR/Cas9システム<sup>\*1</sup>を基盤とする多重ゲノム編集技術を用いて、 $\beta$ -cateninのエクソン3<sup>\*2</sup>をスキップすることで内在性 $\beta$ -cateninを活性化させた肝がん細胞を作製しました。 $\beta$ -catenin活性化型肝がん細胞では、CCL20やCXCL2などのサイトカイン<sup>\*3</sup>の発現低下が認められ、免疫監視の回避に寄与している可能性が示唆されました。
- 近年、がん免疫療法の有効性が注目されていますが、その代表である免疫チェックポイント阻害剤<sup>\*4</sup>は $\beta$ -catenin活性化型肝がんには無効であるという報告があります。本研究は $\beta$ -catenin変異肝がんに対する新規がん免疫療法の開発への一助となります。

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍医学分野の田中真二教授、島田周助教、新部彩乃助教、下川雅弘非常勤講師、秋山好光講師、赤須雅文大学院生の研究グループは、ウイルス制御学の山岡昇司教授、肝胆膵外科学の田邊稔教授との共同研究で、新規多重ゲノム編集技術を用いて $\beta$ -catenin活性化型肝がんの免疫監視の回避機構を解明しました。この研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)次世代がん医療創生研究事業(P-CREATE)、肝炎等克服緊急対策研究事業、文部科学省科学研究費補助金、高松宮妃癌研究基金研究助成金の支援のもとでおこなわれたもので、その研究成果は、国際科学誌Scientific Reports(サイエンティフィック・リポート)に、2021年8月24日午前10時(英国夏時間)にオンライン版で発表されます。

#### 【研究の背景】

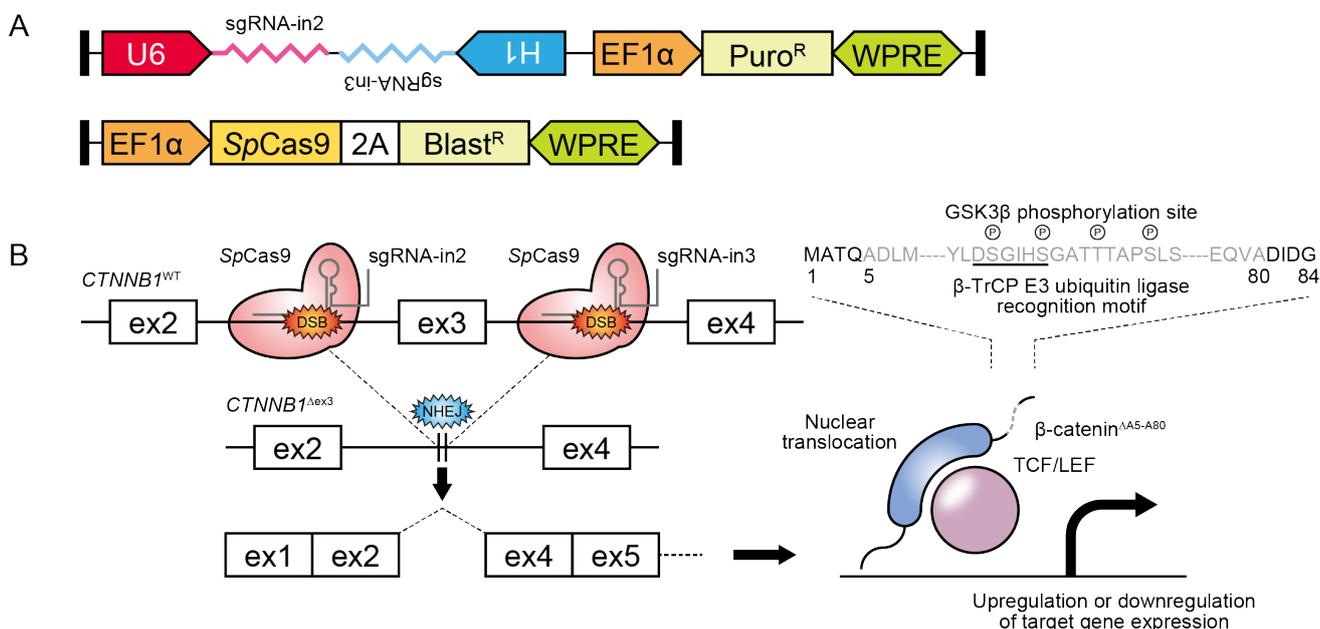
肝がんは世界で2番目に、日本でも5番目に多いがん死亡原因となっています。研究グループは以前の研究で、肝がんが①*TP53*遺伝子変異があり、増殖性、幹細胞性、染色体不安定性を示す予後不良群(MS1)、②*CTNNB1*( $\beta$ -catenin)活性化型変異があり、腫瘍免疫が抑制されている群(MS2)、③肥満や糖尿病などのメ

タバリックシンドロームと関連があり、免疫疲弊を示す群 (MS3) の 3 群に分類されることを報告しました (Shimada, Tanaka et al. EBioMedicine 2019)。本研究では、②の  $\beta$ -catenin 活性化型肝がん腫瘍免疫が抑制されるメカニズムを解明し、新規がん免疫療法の開発につなげることを目的としました。

### 【研究成果の概要】

肝がんでは  $\beta$ -catenin の変異はエクソン 3 に集積していることが知られています。これは、エクソン 3 に対応するアミノ酸配列に含まれるセリン/スレオニンがリン酸化されると  $\beta$ -catenin は分解されてしまいますが、エクソン 3 の変異によりアミノ酸が置換されたり、エクソン 3 がスキップされたりすると、 $\beta$ -catenin が安定化し、 $\beta$ -catenin の核内移行や  $\beta$ -catenin シグナル経路の活性化が生じ、がん化が促進されるためです。 $\beta$ -catenin を活性化させるために、従来の研究では変異型  $\beta$ -catenin を外来的に強制発現させる手法がとられていましたが、生理的ではありませんでした。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 システムを利用してイントロン 2 とイントロン 3 を同時に切断し、非相同末端結合<sup>※5</sup>により内在性  $\beta$ -catenin のエクソン 3 をスキップさせることに成功しました (図 1)。ヒトおよびマウス肝がん細胞で  $\beta$ -catenin のエクソン 3 をスキップさせると、 $\beta$ -catenin の核内移行と  $\beta$ -catenin シグナル経路の活性化が認められました。

図 1

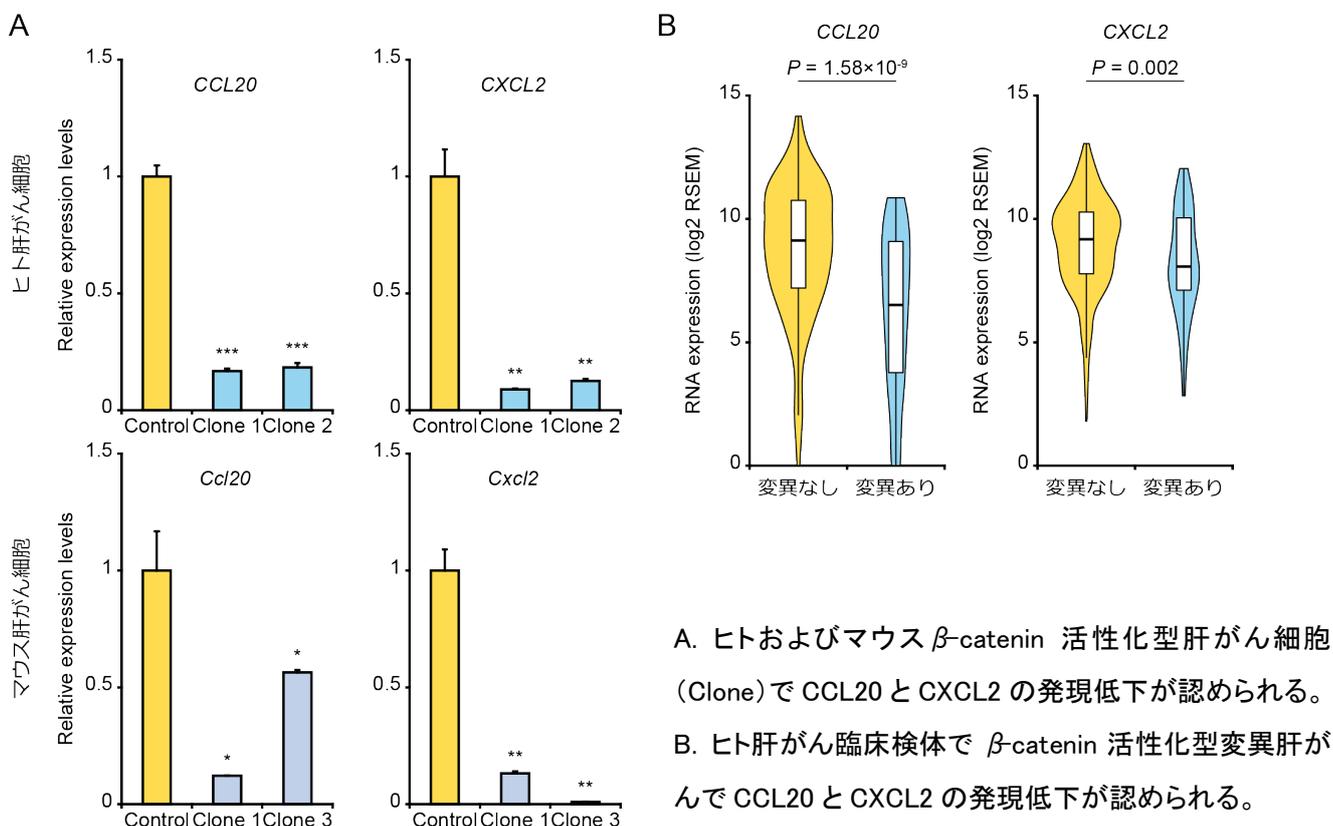


A. 新規開発した多重ゲノム編集ベクターの模式図。B.  $\beta$ -catenin のエクソン 3 スキッピングの模式図。

$\beta$ -catenin 活性化型肝がん細胞の遺伝子発現を解析すると、免疫関連遺伝子群の発現低下が顕著に認められました。そして、ヒトおよびマウス  $\beta$ -catenin 活性化型肝がん細胞で共通して発現低下している遺伝子として、4 種類のサイトカインを同定しました。ヒト肝がん臨床検体 373 症例のエクソーム・トランスクリプトーム解析<sup>※6</sup>の公開データから、 $\beta$ -catenin 活性化型変異肝がんでは、4 種類の候補サイトカインのうち CCL20 と CXCL2

という免疫賦活化サイトカインが有意に発現低下していることがわかりました(図 2)。また、T 細胞の細胞傷害性解析や同種皮下移植腫瘍の免疫組織化学的解析により、マウス  $\beta$ -catenin 活性化型肝がん細胞が免疫監視を回避していることが明らかになりました。

図 2



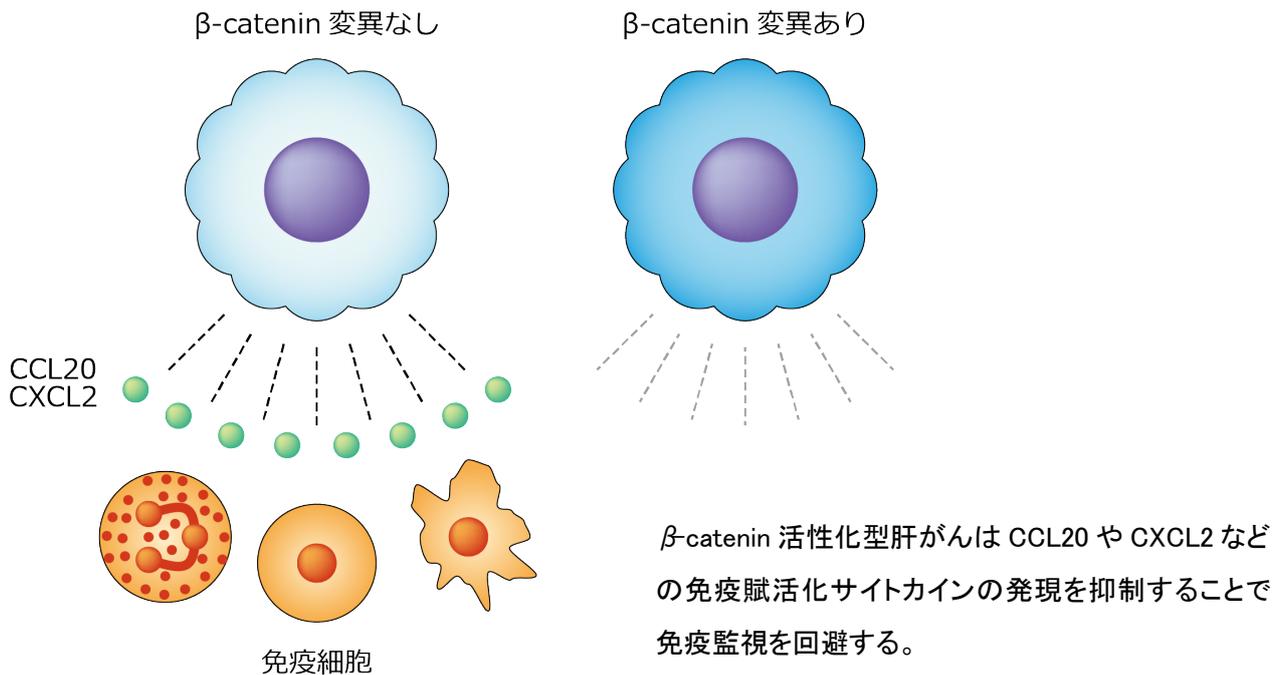
A. ヒトおよびマウス  $\beta$ -catenin 活性化型肝がん細胞 (Clone) で CCL20 と CXCL2 の発現低下が認められる。  
B. ヒト肝がん臨床検体で  $\beta$ -catenin 活性化型変異肝がん で CCL20 と CXCL2 の発現低下が認められる。

### 【研究成果の意義】

多重ゲノム編集技術を新規開発し、エクソン 3 をスキップさせることで内在性  $\beta$ -catenin を活性化させることに成功しました。この多重ゲノム編集技術は、エクソンをスキップさせるだけでなく、複数の遺伝子を同時にノックアウトさせるなど応用範囲の広い技術です。

近年、免疫チェックポイント阻害剤に代表されるがん免疫療法が注目されています。肝がんでも免疫チェックポイント阻害剤の有効性が実証されてきていますが、 $\beta$ -catenin 活性化型変異肝がんには無効であるという報告があります (Harding et al. Clin Cancer Res 2019)。本研究では、 $\beta$ -catenin 活性化型肝がんは CCL20 や CXCL2 などの免疫賦活化サイトカインの発現を抑制することで、免疫監視を回避していることが明らかになりました(図 3)。CCL20 は腫瘍内注入によって樹状細胞を誘導し、腫瘍免疫を賦活化する作用を持つ治療候補として注目されており、本研究成果は  $\beta$ -catenin 活性化型肝がんの新規がん免疫療法の開発への一助となると考えられます。

図 3



### 【用語解説】

#### ※1 CRISPR/Cas9 システム

DNA 配列に相補的な配列をもつガイド RNA が結合すると、Cas9 蛋白質が誘導され、DNA 配列が切断されるという分子機構です。この分子機構を利用して、DNA 配列を操作することをゲノム編集といいます。

#### ※2 エクソン・イントロン

遺伝子 DNA 配列のうち、蛋白質に翻訳される部分をエクソン、翻訳されない部分をイントロンといいます。エクソンに変異が生じたり、エクソンがスキップされたりすると、アミノ酸・蛋白質異常が生じ、がん化などの細胞形質変化が生じます。

#### ※3 サイトカイン

細胞から放出される、免疫を調節する低分子蛋白質です。免疫を活性化させたり、抑制させたりする機能があります。サイトカイン毎に作用する免疫細胞が異なります。

#### ※4 免疫チェックポイント

近年注目されているがんの免疫監視回避機構の一つです。正常細胞は免疫が過剰に作用しないように PD-1/PD-L1 経路などの免疫チェックポイントを利用して、免疫を調節しています。がん細胞は免疫チェックポイントを悪用して、免疫を回避していると考えられています。がん免疫チェックポイント阻害剤を投与すると、免疫が正常に作用するようになり、がん細胞が排除されます。

#### ※5 非相同末端結合

DNA 修復メカニズムの一つです。DNA 二重鎖が切断された際に、断端同時に直接結合します。結合するときに DNA 配列に異常が生じるため、変異の原因となります。

#### ※6 エクソーム・トランスクリプトーム解析

遺伝子の変異や発現を網羅的に解析することです。近年、様々な腫瘍についてエクソーム・トランスクリプトーム解析が行われ、そのデータが一般公開されるようになってきました。

### 【論文情報】

掲載誌: Scientific Reports

論文タイトル: Intrinsic activation of  $\beta$ -catenin signaling by CRISPR/Cas9-mediated exon skipping contributes to immune evasion in hepatocellular carcinoma

### 【研究者プロフィール】

島田 周 (シマダ シュウ) Shimada Shu

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

分子腫瘍医学分野 助教

#### ・研究領域

難治性がんの分子生物学的解析と治療開発

田中 真二 (タナカ シンジ) Tanaka Shinji

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

分子腫瘍医学分野 教授

#### ・研究領域

難治性がんの分子生物学的解析と治療開発

### 【問い合わせ先】

#### <研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

分子腫瘍医学分野 氏名 島田周(シマダシュウ)

TEL:03-5803-5183 FAX:03-5803-0125

E-mail: shimada.monc@tmd.ac.jp

分子腫瘍医学分野 氏名 田中真二(タナカシンジ)

TEL:03-5803-5182 FAX:03-5803-0125

E-mail: tanaka.monc@tmd.ac.jp

#### <報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp