

CRISPR/Cas9システムを用いたメルケル細胞 ポリオーマプロウイルスの不活化による メルケル細胞癌細胞株 (MKL-1) の増殖抑制

堀口勝陽¹⁾*, 畦田真未¹⁾*, 荒武八起²⁾*, 竹ノ内博之³⁾, 岡山昭彦⁴⁾*, 梅木一美^{1,2,4)}

Cell growth suppression of Merkel cell carcinoma cell line (MKL-1) through the inactivation of
Merkel cell polyoma provirus using CRISPR/Cas9 system

Shoyo Horiguchi¹⁾*, Mami Azeta¹⁾*, Yatsuki Aratake²⁾*, Hiroyuki Takenouchi³⁾, Akihiko Okayama⁴⁾*, Kazumi Umeki^{1,2,4)}

要旨

メルケル細胞癌(Merkel cell carcinoma; MCC)は、孤立性の皮膚あるいは皮下腫瘍であり急速な増殖を示す悪性度の高い難治性の癌である。MCCの発癌にはメルケル細胞ポリオーマウイルス(Merkel cell polyomavirus; MCPyV)が関わっていることが知られている。宿主細胞に組み込まれたMCPyVのLarge T遺伝子(LT)にナンセンス変異を伴う変異LTがMCCの発がんに関与していることが報告されている。本研究ではCRISPR/Cas9を用いてこの変異LT遺伝子を失活させることによるMCC細胞株の増殖抑制を試みた。LT遺伝子の転写開始点近傍を標的としたガイドRNA(sgRNA194)とCas9の混合溶液(sgRNA194/Cas9)をメルケル細胞癌細胞株(MKL-1)に導入した。sgRNA/Cas9導入細胞の標的配列を増幅し塩基配列を解析した結果、塩基の欠損等の変異が導入されていることが明らかになった。さらにsgRNA 194を導入したMKL-1細胞は、細胞増殖が低下していることが明らかになった。ウエスタンブロット法を用いてLT蛋白質の発現量を調べたところ、sgRNA194/Cas9導入後のMKL-1細胞でLT蛋白質の著明な低下が認められた。また、LT mRNAの塩基配列を決定した結果、sgRNA194/Cas9を導入したMKL-1細胞ではアレルの78%に欠損等の変異が認められたことから、sgRNA194/Cas9により変異が導入されたmRNAは蛋白質に翻訳されなかったものと推定された。一方、sgRNA194と相同性の高いヒトゲノム4領域についてオフターゲット効果を調べたが、欠損および挿入は認められなかった。本研究でCRISPR/Cas9によりMCCの発癌の原因と考えられている変異LT遺伝子に欠失などの変異を導入した結果、変異LT蛋白質の発現低下と細胞増殖が抑制されることが明らかになった。この方法を発展させることでMCCの治療法が開発される可能性が示唆された。

Abstract

Merkel cell carcinoma (MCC) is a highly proliferative malignancy that presents as a solitary cutaneous or subcutaneous nodule. Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is involved in the carcinogenesis of MCC. Previous studies reveal that carcinogenesis is induced by the truncated large T (LT) protein encoded by mutant LT gene of MCPyV integrated in host cell genome, which harbors nonsense mutations. In this study, we used CRISPR/Cas9 to inactivate the mutant LT gene and attempted to suppress the growth of the MCC cell line, MKL-1. The newly designed single-guide RNA and Cas9 (sgRNA194/Cas9) were used to process the mutant LT gene in MKL-1 cell. Transfection of sgRNA194/Cas9 into MKL-1 cells decreased cell proliferation. Through western blot analysis, the expression level of LT protein was totally reduced in sgRNA194/Cas9-transfected MKL-1 cells. When the LT mRNA sequence was examined, 78% of the sgRNA194/Cas9-transfected MKL-1 cells showed mutations such as deletions. This study demonstrated the inhibition of truncated LT protein expression and suppression of the MCC cell proliferation, suggesting a potential treatment for MCC through improvement of this method.

キーワード：メルケル細胞癌、メルケル細胞ポリオーマウイルス、LT 遺伝子、CRISPR/Cas9

Key words : Merkel cell carcinoma, Merkel cell polyomavirus, LT genes, CRISPR/Cas9

2022年11月25日受付 / 2023年1月27日受理

- 九州保健福祉大学保健科学研究科 〒882-8508 宮崎県吉野町1714-1
Graduate Department of Health Science Studies, Kyushu University of Health and Welfare School of Medical Life Science, 1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-8508 Japan
- 九州保健福祉大学生命医科学部生命医科学科 〒882-8508 宮崎県吉野町1714-1
Department of Medical Life Science, Kyushu University of Health and Welfare School of Medical Life Science, 1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-8508 Japan
- 宮崎大学医学部附属病院輸血・細胞治療部 〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200
Department of Blood Transfusion and Cell Therapy, University of Miyazaki Hospital, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan
- 宮崎大学医学部内科学膠原病感染症病態学分野 〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200
Department of Rheumatology, Infectious Diseases and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki 889-1692, Japan

1) * 現所属 伊勢赤十字病院, 2) * 現所属無, 4) * 現所属 宮崎県健康づくり協会

Corresponding author: 梅木一美

1. はじめに

メルケル細胞癌 (Merkel cell carcinoma; MCC) は、1972年に Cyril Toker によって trabecular carcinoma of the skin として初めて報告された¹⁾。米国では年間 1,200 例ほどの患者が報告されており白人、男性に多い傾向にある^{2,3)}。MCC は、神経内分泌機能を持つ侵襲性の高い稀な癌であり、組織学的特徴の分析や病変の腫瘍マーカーの発現が診断の根拠として用いられる。孤立性の皮膚あるいは皮下腫瘍が特徴的な病変であり急速な増殖を示す。発生部位は、日光にさらされている頭や首に頻度が高い^{4,6)}。病変部位は赤色から紫色を呈し無症候性の結節であるため、他の良性病変や悪性病変と誤診されることが知られている⁷⁾。MCC は無症候性、急激な拡大、免疫抑制、50 歳以上、UV 暴露の臨床的特徴「AEIOU」を示す^{7,8)}。治療として腫瘍の切除が第一選択となるが、実施できない場合には放射線療法が選択される。しかしながら、現在でも効果的な治療法は存在しないのが現状である⁹⁾。

MCC 発癌原因の一つとして、メルケル細胞ポリオーマウイルス (Merkel cell polyomavirus; MCPyV) が関わっていることが知られている。MCPyV は、2008 年に MCC から発見され¹⁰⁾、MCC の半数以上に MCPyV プロウイルスの組み込みが認められており、他のポリオーマウイルスと同様の構造を有している。その構造の中で *Large T* 遺伝子 (*LT*) と *small T* 遺伝子 (*sT*) が MCC 発癌に関与している¹⁰⁻¹⁷⁾。*LT* は、細胞増殖に必要なドメイン CR1、DnaJ、Rb binding およびウイルス複製に必要なドメイン OBD、Helicase domain で構成されている。MCC に組み込まれている MCPyV では、Rb binding と Helicase domain の間に終止コドンが生じる変異が多く確認される¹⁸⁾。本研究に使用した MCC 細胞株である MKL-1 細胞も他の MCC と同様、Helicase domain の上流に終止コドンが存在する (MKL-1 細胞の *LT* 遺伝子を MKL-*LT* とする)。この変異により、網膜芽細胞関連蛋白質 (RB1) 結合の機能は保持されるが Helicase domain、cell growth inhibitory domains は失われることが報告されている^{19,20)}。変異 *LT* はがん抑制遺伝子産物 Rb と結合してその機能を抑制し MCC 発癌を誘発すると考えられている^{18, 21-23)}。以上のように変異 *LT* は MCC の発癌と増殖に大きな役割を果たしていることが知られている。我々は MCPyV プロウイルスの *LT* 遺伝子を CRISPR/Cas9 で失活させることにより MCC 細胞株の増殖抑制を試みた。この方法で細胞増殖を抑制することが可能であれば将来的に MCC の *LT* が

治療の標的分子になり得ることが期待される。

2. 材料と方法

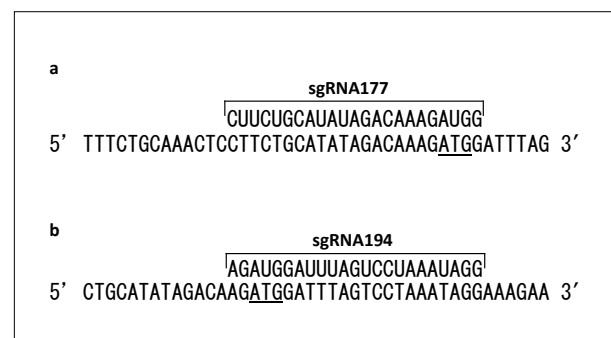
2.1 細胞株、遺伝子組換え実験および利益相反

MKL-1 細胞株は株式会社ケー・エー・シーから購入した。MKL-1 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI-1640 培地 (ナカライテスク) を用いて培養した。本研究は遺伝子・核酸組換え実験安全委員会の承認下で実施した (九州保健福祉大学承認番号 19-4)。なお、本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

2.2 *LT* 遺伝子ガイド RNA (sgRNA) の設計および CRISPR/Cas9 の MKL-1 細胞への導入

Synthetic guide RNA (sgRNA) の設計は CRISPR/Cas guide RNA デザインソフトウェア CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて *LT* 遺伝子配列 (Accession no. FJ173815) から sgRNA の候補配列を検索し、遺伝子産物の失活が期待される翻訳開始点近傍の PAM 配列を利用した 2 つの配列 sgRNA177 (5'-CUUCUGCAUAUAGACAAAGAUGG-3') と sgRNA194 (5'-AGAUGGAUUUAGUCCUAAAUAUGG-3') を sgRNA 候補として選択した (図 1)。sgRNA と Cas9 の導入は以下のように実施した。5 mg/mL TrueCut™ Cas9 Protein v2 (Thermo Fisher Scientific Invitrogen™) 3.2 μL, 100 μM sgRNA 0.9 μL および Neon™ Transfection System Kit 内 Resuspension buffer R (Thermo Fisher Scientific Invitrogen™) 54.0 μL を混和し、20 分間室温でインキュベートした。コントロールとして、陽性コントロール TrueGuide sgRNA Positive Control HPRT1 human (Thermo Fisher, 5'-GCAUUUCUCAGUCCUAAACA-3')、陰性コントロール

図 1. sgRNA の塩基配列の設計



アンダーラインは *LT* 遺伝子の翻訳開始点を示す。(a) sgRNA177 は翻訳開始点の上流配列を切断する。(b) sgRNA 194 は翻訳開始点の 12 ~ 13 塩基下流を切断する。

TrueGuide Synthetic sgRNA Negative Control (Thermo Fisher, 5' -AAAUGUGAGAUCAGAGUAAU-3') を使用した。PBSで洗浄したMKL-1細胞 (2×10^7 cells/mL) 60.0 μ Lに、上記の手順で調製したそれぞれのsgRNAとCas9複合体 (sgRNA/Cas9) 60.0 μ Lにその混合液100.0 μ LをNeon Transfection System (Thermo Fisher Invitrogen™)を用いて1,700 V、20 msecの条件でエレクトロポレーションを行った。CRISPR/Cas9を導入した細胞は5% CO₂存在下37°Cで2日~6日間培養した。

2.3 Genomic Cleavage Detection Kitを用いた変異導入のスクリーニング

LT遺伝子への変異導入のスクリーニングにはGene-*Art*™ Genomic Cleavage Detection Kit (Thermo Fisher)を用い添付文書に従い実施した。CRISPR/Cas9を導入した細胞を回収し1,500 rpm、5 min遠心後上清を除去し、その細胞沈査にProtein Degradarを含むCell lysis bufferを50.0 μ Lを添加し68°C 15 min反応後、95°C 10 min加温し細胞溶解液とした。LT遺伝子の増幅はプライマーとしてLT-80F (5' -CAGTATCTAAGGGCAGATCC-3') およびLT-418R (5' -ATCTCTTCAGTGAAGACT-3')を終濃度で200 nM含む増幅試薬48.0 μ Lに上記の細胞溶解液2.0 μ Lを添加し、95°Cで10 min加温後、98°C 10 sec、55°C 20 sec、72°C 30 secの40サイクルで行った。次に、この増幅産物3.0 μ Lに10×Detection Reaction Buffer 1.0 μ Lおよび精製水5.0 μ Lを加え、95°C 5 min加温した。その後、85°C 10 sec保持後、1分間に6°Cの速度で25°Cにまで温度を下げた。この溶液にDetection Enzyme 1.0 μ L加え37°Cで60 min反応させた後、1%アガロース電気泳動を行い変異導入の確認を行った。

2.4 MKL-1細胞のLT遺伝子塩基配列の決定

PCR産物の大腸菌ベクターへの組み込みはpGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)を用いて添付文書に従って行った。上記2.3で得られたLT遺伝子の増幅産物をpGEM®-T Easy Vectorにライゲーションした溶液を*E. coli* JM109 Competent Cells (タカラバイオ)に導入した。このプラスミドを導入した大腸菌を0.01% X-gal、100 μ g/mLアンピシリンおよび100 μ M IPTGを含むLB寒天培地に塗り広げ37°Cで1晩培養した。培養後発育した白色コロニーの一部を採取し25 mM NaOH 25.0 μ Lに懸濁し98°C 5 min加温後、100 μ M Tris-HCl 25.0 μ Lを加え、PCRの鋳型として用いた。イ

ンサートDNAのPCR産物を得るために大腸菌ベクターのマルチクローニング配列に相当するプライマーM4 (5' -GTTTCCAGTCACGAC-3') およびRV (5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3')を用いTaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ)で98°C 10 sec加温後、98°C 10 sec、55°C 10 sec、72°C 30 secのサイクルを25回繰り返した。増幅産物は1%アガロース電気泳動を行いインサートの組み込みが確認されたコロニーについて塩基配列を決定した。塩基配列決定はエタノール沈殿法で精製したPCR産物をBigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)でラベルし、3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems)で配列を解析した。

2.5 CRISPR/Cas9導入後のMKL-1細胞数測定

CRISPR/Cas9を導入したMKL-1細胞を10% fetal bovine serum (FBS)を含むRPMI-1640培地で培養した。導入後2日、4日、6日の細胞数を細胞計算盤(C-*Chip*) (エア・ブラウン株式会社)を使用し顕微鏡下で測定した。

2.6 ウェスタンブロット法を用いたMKL-1細胞におけるCRISPR/Cas9導入後のLT蛋白質発現量の解析

CRISPR/Cas9を導入したMKL-1細胞を2~6日間培養しそれぞれ回収し、 1.0×10^6 個/mLの濃度に5% 2-メルカプトエタノールを含むSDS-PAGE sample bufferで調整した。この溶液を98°Cで5分間加温後、3分間超音波処理した後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で展開した。泳動後のゲルはFluoroTrans® W Membrane (Pall Corporation)に30 Vで10 min、120 Vで40 minの2段階で転写を行い、10%スキムミルク(SM)を含む0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート/PBS(washing buffer)中で4°C 16時間blockingを行った。1次抗体反応は0.5% SM/washing bufferで1,000倍希釈した抗MCPyV large T-antigen抗体(Santa Cruz Biotechnology)および内部コントロール用には1,000倍希釈した抗 α -Tubulin抗体(B-7)(Santa Cruz Biotechnology)を使用し、室温で1時間反応させた。1次抗体をwashing bufferで洗浄後、0.5% SM/washing bufferで10,000倍希釈したAnti-Mouse IgG(H+L), HRP Conjugate(プロメガ)を2次抗体として用い室温で1時間反応させた。メンブレンをwashing bufferで3回、PBSで1回洗浄後、Immobilon Forte Western HRP基質(メルクミリポア)を添加し、Chemiluminescence Imaging System(Vilber Lourmat Sté)を用いて化学発光の画像を撮影した。

表1. リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーとプローブ

Primer/Probe	Position*	Sequence
LT Probe	931-904	5' - CCGAAGCTGAATCCTCCTGATCTCCACC -3'
LT Primer F	409-429, 861-863	5' - GACTTCTCTATGTTTGTGATGAGGTTG-3'
LT Primer R	971-952	5' - GTTGGTCCCGTGTGGATTGG -3'
GAPDH Probe	363-388	5' - TGGAGTCCACTGGCGTCTTCACCACC -3'
GAPDH Primer F	341-359	5' - GATGCTGGCGCTGAGTACG -3'
GAPDH Primer R	444-423	5' - GCAGAGATGATGACCCTTTTGG -3'

Position* : 塩基配列の番号は LT 遺伝子 Accession no. FJ173815 および GAPDH 遺伝子 NM_002046 に従った。

2.7 CRISPR/Cas9 導入後の LT mRNA の発現量の推移および塩基配列決定

CRISPR/Cas9 を導入後 2 日間および 6 日間培養した MKL-1 細胞に TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher) を用いて RNA を調整した。逆転写反応は PrimeScript Reverse Transcriptase (タカラバイオ) を用いて添付文書に従って相補的 DNA (cDNA) を得た。LT mRNA および GAPDH mRNA の発現量は表 1 に示すプライマーと TaqMan Probe を用いたリアルタイム RT-PCR 法で測定した。増幅試薬には Premix Ex Taq (タカラバイオ) を用い、LT mRNA の発現量は GAPDH mRNA をレファレンスとして $\Delta\Delta C_t$ 法で解析した。

mRNA の塩基配列決定には上記の cDNA を鋳型に用いて、LT-80F および LT-418R をプライマーに、増幅試薬として TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version を用いて 98 °C で 20 sec 加温した後、98°C 10 sec、55°C 10 sec、72°C 30 sec を 40 サイクルの増幅条件で RT-PCR を実施した。さらに、これらの増幅産物を上述 2.4 と同じ方法で pGEM®-T Easy Vector に組み込み大腸菌にサブクロニングした後、塩基配列を決定した。

2.8 CRISPR/Cas9 導入 MKL-1 細胞におけるオフターゲット効果の確認

MKL-1 細胞のヒトゲノムへのオフターゲット効果を sgRNA194 と最も相関性の高かった 4 領域 (8q22,3 ; 13q32,2 ; 16p13,13 ; 16p12,1) について調べた。sgRNA 177/Cas9 を導入後 2 日目の MKL-1 細胞ゲノム DNA を表 2 に示すプライマーと増幅試薬を用いて 95 °C で 10 min 加温後、98°C 10 sec、55°C 20 sec、72°C 30 sec のサイクルを 40 回の条件で増幅した。これらの増幅産物を上述 2.4 と同じ方法で大腸菌にサブクロニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

2.9 統計学的解析および検定法

統計解析には Paired T-test を用い、p 値が <0.05 以下を有意とした。全ての統計解析には Microsoft 365 Excel (Microsoft) を用いた。

表2. オフターゲット解析に用いたプライマー

増幅領域	Primer	Sequence
8q22,3	OFF-1F	5' - CCCTATCTCAAGGATGCAAG -3'
	OFF-1R	5' - TGAGGGACATAAAGGAAGGTG -3'
13q32,2	OFF-2F	5' - CACCATATAGTAGAAACCTC -3'
	OFF-2R	5' - TCAGCCCTTCCCTACTCTGA -3'
16p13,13	OFF-3F	5' - ACGCCATCTAGATCCTGCTC -3'
	OFF-3R	5' - GTGTGCTTGGCTGCTTCATC -3'
16p12,1	OFF-4F	5' - CCTGCAAAGGACAGCTTCTCA -3'
	OFF-4R	5' - CTTTCCCAAATCCCACAGTTG -3'

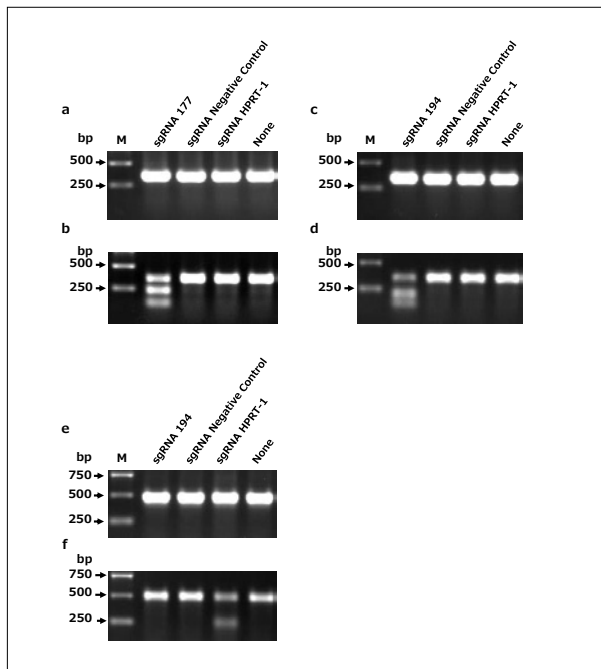
増幅領域はヒト染色体上の位置を示す。

3. 結果

3.1 Genomic Cleavage Detection Kitを用いたLT遺伝子の変異導入のスクリーニング

本研究で用いた sgRNA177 および sgRNA 194 が LT 遺伝子の標的配列に変異を導入可能か調べるため、CRISPR/Cas9 導入後 2 日間培養した MKL-1 細胞について Genomic Cleavage Detection Kit を用いてスクリーニングを行った。陰性対象として sgRNA Negative control、陽性コントロールとして sgRNA HPRT-1 を導入した MKL-1 細胞および未導入の細胞を用いた。図 2 に示すように LT 遺伝子領域では sgRNA177 (図 2b) と sgRNA194 (図 2d) を導入した細胞のみで増幅産物に変異が導入されており、陽性コントロールおよび陰性コントロールの sgRNA 導入細胞では変異による切断が認められなかった (図 2b, d)。一方、陽性コントロールとして用いた sgRNA HPRT-1 の標的配列である HPRT-1 の増幅産物は sgRNA HPRT-1 を導入した細胞のみに変異が導入され切断されていることが示された (図 2f)。これらの結果より sgRNA177 と sgRNA 194 は

図 2. Genomic Cleavage Detection Kit を用いた LT 領域における変異導入の解析



加熱した PCR 産物に変異が導入されれば、再アニールした DNA 断片の mismatches は cleavage enzyme により切断される。(a) sgRNA177/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の LT 遺伝子増幅産物の電気泳動像を示す。(b) a の増幅産物を cleavage enzyme で処理した後の電気泳動像を示す。(c) sgRNA194/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の LT 遺伝子増幅産物の電気泳動像を示す。(d) c の増幅産物を cleavage enzyme で処理した後の電気泳動像を示す。(e) それぞれの sgRNA を導入した MKL-1 細胞の HPRT-1 遺伝子増幅産物の電気泳動像を示す。(f) e の増幅産物を cleavage enzyme で処理した後の電気泳動像を示す。

LT 遺伝子に特異的に変異を導入出来ることが推定された。

3.2 CRISPR/Cas9を導入したMKL-1細胞のLT遺伝子塩基配列

sgRNA177/Cas9 および sgRNA194/Cas9 を導入後 2 日間培養した MKL-1 細胞の LT 遺伝子領域をサブクローニングして塩基配列を決定した結果、sgRNA 177/Cas9 では 22 クローン中 18 クローン (82%) に塩基の欠損および挿入変異が検出されたが、全ての変異が翻訳開始点より上流に存在した (図 3a)。sgRNA194/Cas9 の導入では 28 クローン中 18 クローン (64%) に塩基の欠損および挿入変異が検出され、これらの変異によりほとんどのクローンはフレームシフトが生じ、変異の下流直近に終止コドンが発生することから (図 3b)、57% のクローンが全長の蛋白質配列の 80% 以上を欠損すると図考えられた (図 4)。これらの結果より、LT 遺伝子への変異導入に sgRNA194 を選択した。一方、sgRNA Negative control/Cas9 および sgRNA HPRT-1/Cas9 を導入した細胞の LT 遺伝子では PCR 時に発生したと推測される塩基置換を含む 1 クローンを除き変異は認められなかった (図 3c,d,e)。

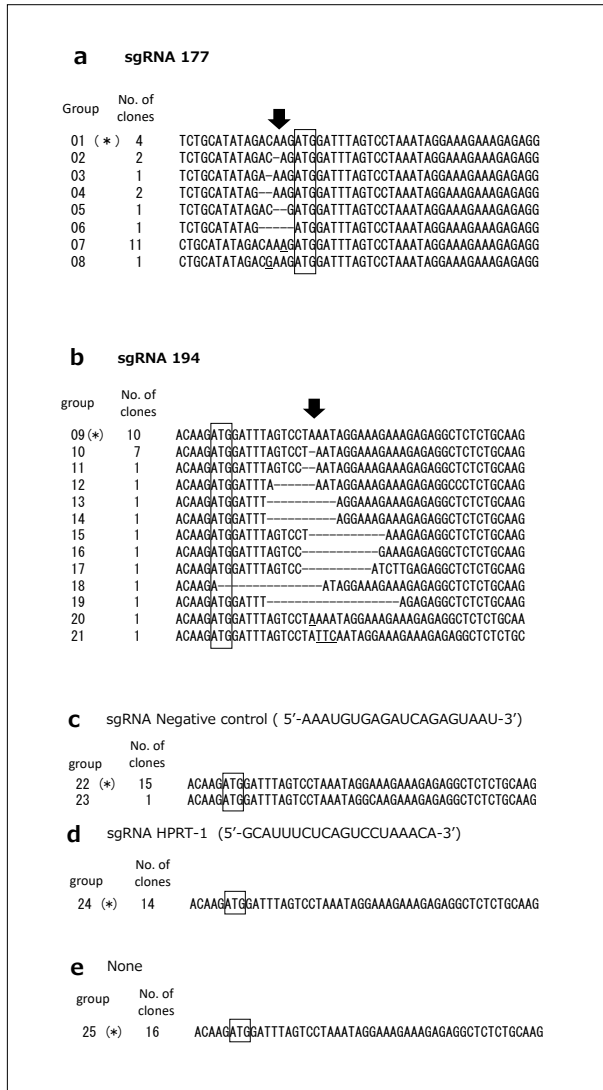
3.3 CRISPR/Cas9導入によるMKL-1細胞の増殖抑制

MCC の LT 遺伝子は発癌と細胞増殖に大きく関わっていることが知られており、LT 遺伝子を失活させることにより MCC 細胞の細胞増殖の抑制が期待される。sgRNA194/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の細胞増殖を調べた結果、sgRNA Negative control を導入した MKL-1 細胞に比較し 2 日目で約 0.7 倍、4 日目が約 0.3 倍、6 日目が約 0.47 倍と細胞増殖が低下していることが明らかになった (表 3, 図 5)。本操作を 2 回行い sgRNA194/Cas9 による増殖抑制は再現性があることを確認した。このように、sgRNA194/Cas9 の導入により MKL-1 細胞の増殖が抑制されていることが示された。

3.4 CRISPR/Cas9導入によるLT蛋白質発現の推移

ウエスタンブロットを用いて LT 蛋白質の発現量を調べたところ、sgRNA194/Cas9 導入後 2 日、4 日、6 日経過した MKL-1 細胞は、sgRNA Negative control/Cas9 を導入した MKL-1 細胞と比較して LT 蛋白質の発現低下が認められた (図 6)。本実験は 2 回実施し再現性があることを確認した。内部コントロールとして測定した tubulin の発現量は sgRNA194/Cas9 導入後の変化は認められなかった (図 6)。

図 3. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の塩基配列の解析



sgRNA を導入した MKL-1 細胞の LT 遺伝子転写開始点周辺の塩基配列を決定し、MKL-LT と比較した。矢印は予想される変異導入部位、ハイフンは欠損した塩基、アンダーラインは挿入された塩基を示す。四角で囲った配列は翻訳開始点 (ATG) を示す。(a) sgRNA177/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の塩基配列 (group 01 ~ 08)。グループ 01 (*) は変異を含まない MKL-LT と同一配列を示す。(b) sgRNA194/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の塩基配列 (group 09 ~ 21)。グループ 09(*) は変異を含まない MKL-LT と同一配列を示す。(c) sgRNA Negative control/Cas9 を導入した MKL-1 細胞 (group 22,23)。グループ 22 (*) は MKL-LT と同一配列を示す。(d) sgRNA HPRT-1/Cas9 を導入した MKL-1 細胞 (group 24)。MKL-LT と同一配列を示す。(e) 未導入の MKL-1 細胞 (group 25)。MKL-LT と同一配列を示す。

3.5 CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞における LT mRNA の発現量の推移および塩基配列の解析

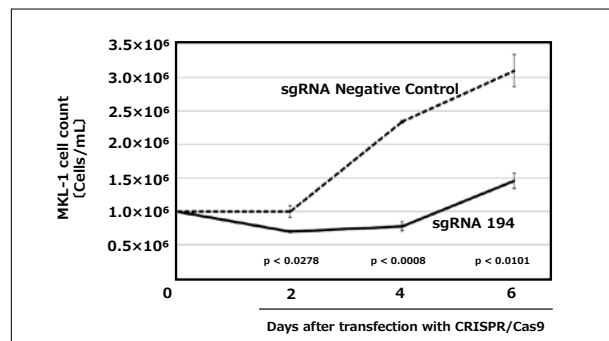
sgRNA194/Cas9 の導入により細胞増殖が抑制された原因を調べるため、CRISPR/Cas9 導入後 2 日目と 6 日目の LT mRNA の発現量とその塩基配列を調べた。リアルタイム RT-PCR で LT mRNA の発現を測定し結果、sgRNA Negative control/Cas9 を導入した MKL-1 細胞に比較して sgRNA194/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の

図 4. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の塩基配列から予想される蛋白質の構造



黒のバーは MKL-LT と同一のアミノ酸配列として翻訳が予想される蛋白質、破線は翻訳されない変異、グループ 12 の欠損部分は 2 アミノ酸の欠失を示す。バー内の白抜きは塩基挿入により導入されたアミノ酸を示す。

図 5. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞増殖の推移

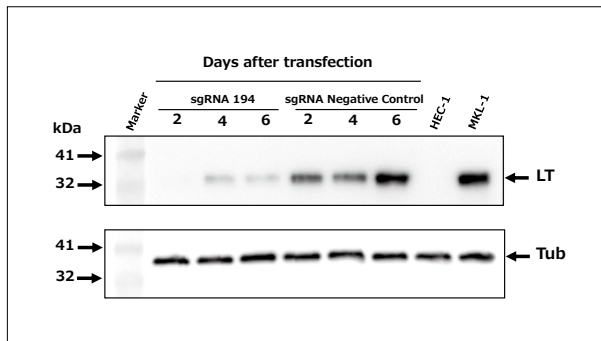


MKL-1 細胞 (1.0×10^6 cells/mL) に CRISPR/Cas9 を導入し 2 日、4 日および 6 日目に細胞数を測定した (N=3)。実線は sgRNA193/Cas9 を導入した MKL-1 細胞、破線は sgRNA Negative control/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の細胞数の推移を示す。sgRNA-NC と sgRNA-194 の有意差を検定し P 値を示した。エラーバーは平均±標準偏差を示す。

表 3. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞増殖の推移

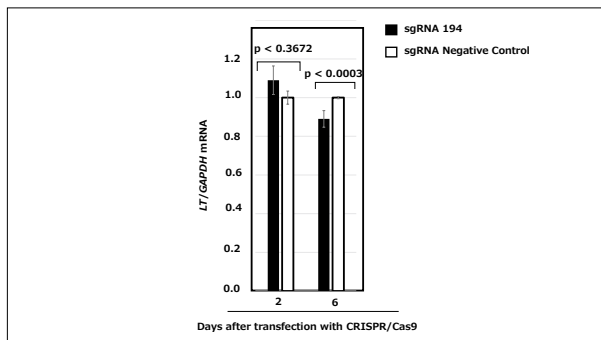
sgRNA	CRISPR/Cas9 導入後の日数		
	2 days	4 days	6 days
sgRNA 194	$7.1 \times 10^5 \pm 2.1 \times 10^4$	$7.9 \times 10^5 \pm 6.9 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^5$
sgRNA NC	$1.0 \times 10^6 \pm 8.7 \times 10^4$	$2.3 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^4$	$3.1 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^5$

図 6. ウェスタンブロット法による CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の LT 蛋白質の発現



内因性コントロールとして Tubulin を使用した。子宮頸内膜癌細胞株 HEC-1 は陰性コントロールとして使用した。未処理 MKL-1 細胞を陽性コントロールとして使用した。

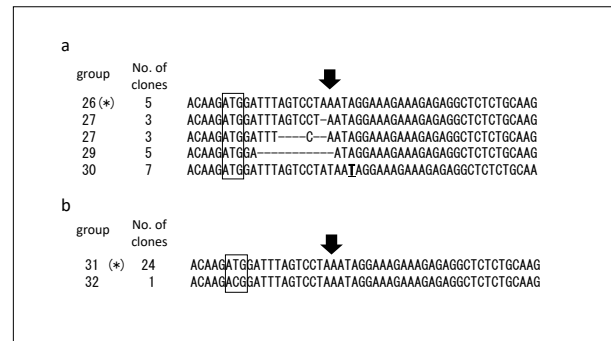
図 7. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の LT mRNA 発現量の推移



LT 遺伝子を GAPDH 遺伝子で平準化して表示した。sgRNA NC の mRNA 発現量を 1 とした時の sgRNA 194 mRNA 発現量の比較を示す。エラーバーは平均±標準偏差 (t 分布) を示す。

培養 2 日目は sgRNA Negative control と sgRNA194 に有意差は認められなかったが、6 日目では sgRNA194 を導入した細胞の LT mRNA の低下が認められた (図 7)。次に、sgRNA194/Cas9 導入後 2 日目と 6 日目に発現した LT mRNA の塩基配列を調べた (図 8)。sgRNA194/Cas9 導入後 2 日間培養した MKL-1 細胞の LT mRNA の塩基配列は、23 クローン中 18 クローン (78%) に欠損あるいは挿入がみられた (図 8a)。一方、6 日間培養をおこなった MKL-1 細胞の LT mRNA の塩基配列は 27 クローン中 1 クローンに置換がみられたが欠損によるフレームシフトを伴う変異は全く認められなかった (図 8b)。以上の結果より sgRNA194/Cas9 の導入後 2 日目では機能の失活が予想される変異型 LT mRNA が検出されたが、培養日数の経過とともに MKL-1 細胞の LT 遺伝子と同じ塩基配列を有する mRNA が主に発現されることが示された。

図 8. CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞で発現される LT mRNA 塩基配列の解析



sgRNA194/Cas9 を導入した MKL-1 細胞の LT 遺伝子翻訳開始点周辺の塩基配列を決定し、MKL-LT の配列と比較した。(a) sgRNA193/Cas9 導入 2 日後の塩基配列。グループ 26 (*) は MKL-LT と同じ配列を示す。(b) sgRNA193/Cas9 導入 6 日後の塩基配列。グループ 31 (*) は MKL-LT と同じ配列を示す。*, MKL-LT と同一の塩基を示す。矢印は予想される変異導入部位、アンダーラインは挿入された塩基、四角で囲った塩基は翻訳開始点 (ATG) を示す。

図 9. CRISPR/Cas9 導入 MKL-1 細胞における オフターゲット領域の塩基配列解析

Chromosomal locus	sequence	wild type clones /total clones	% of wild type
chr8 (q22.3)	AATCAATTTGTTTAGTCCTAAATAGGCCATATA	24/24	100%
chr13 (q32.2)	GATTTTCATCATTAGTCCTAAATAGGGTTTGGT	24/24	100%
chr16 (q13.13)	AGGCATCTGGGTTAGTCCTAAATAGGAAGTCCT	21/21	100%
chr16 (p12.1)	TATAGAGAAGATTAGTCCTAAATAGGAGGTTTT	24/24	100%

sgRNA193 の配列と相同性の高い 4 領域 (a) 8q22,3、(b) 13q32,2、(c) 16q13,13、(d) 16p12,1 への変異の導入は認められずオフターゲット効果は検出されなかった。下線部は sgRNA193 と相同性を有する塩基配列を示す。

3.6 CRISPR/Cas9 を導入した MKL-1 細胞における オフターゲット効果の解析

sgRNA194 と最も相関性の高かったヒトゲノムの 4 領域 (8q22,3 ; 13q32,2 ; 16p13,13 ; 16p12,1) についてオフターゲットの有無を調べた。これらの領域を増幅後サブクローニングして塩基配列を決定した結果、8q22,3 の 24 クローン、13q32,2 の 24 クローン、16p13,13 の 21 クローンおよび 16p12,1 の 24 クローンの全てが野生型と同一の配列であり欠損等は存在しなかった (図 9)。

4. 考察

MCC は、神経内分泌系の特性を持つ浸潤性が高い稀な皮膚がんである。これらの細胞は、クロモグラニン A、シナプトフィジン、サイトケラチン 20 などの神経内分泌マーカーを発現している²⁴⁾。MCC はメルケル細胞が癌化したものではなく形態が似ていることからそのような名前が付けられており、現在まで MCC の起源細胞は特定されていない。MCC の患者の約 3 分の 1 は死亡することが知られており、初診時に局所領域転移またはリンパ節転移を認め、30% に再発がみられる^{3,25)}。MCC のハイリスク群として高齢、免疫不全、他の皮膚腫瘍の既往歴の存在が知られている。MCC の病因は、MCPyV ゲノム DNA の存在または紫外線への慢性暴露のいずれかに関連しており、これは DNA に複数の変異を引き起こし発がんに導く可能性がある^{26,27)}。注目すべきことに、北半球では MCC 症例の大部分が MCPyV によるものであり、紫外線暴露が多い地域では紫外線による発がんが多い傾向にある。発症要因の異なる 2 つは臨床的、病理組織学的に類似しており、判別にはモノクローナル抗体 (CM2B4) を用いた MCPyV large T-antigen の検出、CK20、CK7、chromogranin、neurofilament および TTF-1 の検出が有用とされている²⁸⁾。本研究では、MCPyV 陽性 MCC に注目し、プロウイルス遺伝子の失活を試みた。

現在まで報告されている MCPyV 陽性 MCC 症例では、LT 遺伝子の CR1、DnaJ、Rb binding 領域の発現は保持されるが Rb binding と Helicase domain の間に終止コドンが生じることで Helicase domain や cell growth inhibitory domains は失われる。変異 LT は Rb binding を保持し、Rb と結合し阻害することで発癌に関与する。Houben ら²⁹⁾ は short hairpin RNA (shRNA) 発現レンチウイルスベクターを使用して変異 T 遺伝子の失活を試み、T 遺伝子ノックダウンによって全細胞株中 MCPyV 陽性 MCC 細胞株の全てが増殖停止または細胞死を起こすことを報告している。対照的に、同様の操作を行った MCPyV 陰性 MCC 細胞株では細胞増殖には影響が無いことから T 遺伝子が発癌原因の一つであることを証明した。shRNA は転写された mRNA を分解するものであるが、本研究では CRISPR/Cas9 を使用しプロウイルス DNA に不可逆的な変異を導入することによって LT 遺伝子自体を失活させた。

本研究で使用した sgRNA177 および sgRNA194 は LT 遺伝子の翻訳開始点の下流に近い PAM 配列 (NGG) を利用して 23 塩基の sgRNA をデザインした後、これ

らの sgRNA と Cas9 を MKL-1 細胞にエレクトロポレーションで導入した。変異導入細胞のプロウイルスの塩基配列を確認したところ、両方の sgRNA で欠損および挿入が認められたが、sgRNA177 で生じた変異のほとんどが LT 遺伝子翻訳開始点の上流で生じていることから、それ以降の研究には翻訳領域に変異が導入された sgRNA194 を使用した。sgRNA194/Cas9 導入後の MKL-1 細胞ではクローン化した 28 クローンの塩基配列を調べたところ、16 クローンに欠損、2 クローンに挿入が検出され、変異の導入効率は 64 % であった。欠損および挿入によって生じたフレームシフトに伴うナンセンス変異で少なくとも全体の 57% のクローンは失活すると推定された。一方、sgRNA HPRT-1、sgRNA Negative Control を導入した MKL-1 細胞や sgRNA 非導入の MKL-1 細胞の塩基配列では、欠損および挿入はみられなかったが、sgRNA Negative control を導入した MKL-1 細胞の 1 クローンに塩基置換が検出された。この原因のひとつとして増幅時の塩基の取り込みエラーによる塩基置換が生じた可能性が推測される。

sgRNA194/Cas9 導入後の MKL-1 細胞の細胞数の推移は、導入後 2 日目から 6 日目において sgRNA Negative Control/Cas9 導入 MKL-1 細胞と比較し細胞数は減少した。この間に認められた増殖は、塩基配列決定の結果から LT 遺伝子に変異が導入されなかった細胞によるものと考えられた。CRISPR/Cas9 導入後 2 日目では sgRNA Negative control と sgRNA194 で mRNA の発現に有意差が認められなかったが、6 日目では sgRNA194 を導入した細胞で LT mRNA の発現が低下していた。sgRNA194 を導入した細胞では LT mRNA の半数以上にフレームシフトが生じ塩基配列の早い段階で塩基配列に終止コドン (premature translation-termination codons, PTCs) が発生することが示された。このような PTCs を有する異常 mRNA はナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD) により分解されることが知られている³⁰⁾。sgRNA194 により変異が導入された LT mRNA は NMD により処理され mRNA 発現が低下したものと考えられる。このように PTC が発生した LT 遺伝子から mRNA は転写されるものの、翻訳される前に NMD により分解された可能性が推定された。今後この sgRNA194 や PTCs を生じる sgRNA による mRNA の発現低下の再現性や NMD が普遍的に生じるか検討する必要がある。さらに NMD を回避して翻訳が行われたとしても不完全な短いペプチドしか翻訳されず抗体との反応性を失ったものと推測された。このような理由から

real-time RT-PCR による LT mRNA とウエスタンブロット解析による LT 蛋白質の発現量に解離が生じたものと考えられた。

Houben らは、short hairpin RNA (hRNA) 発現レンチウイルスベクターを使用して MCPyV 陽性 MCC 細胞株の T 遺伝子を不活化することにより、MCC 細胞の細胞周期が G1 期に集積し、明確な細胞増殖抑制を起こすことを報告している²⁹⁾。細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な転写因子である E2F 蛋白質は Rb で調節されることが知られている。MCC 細胞では変異 LT が Rb を抑制することにより細胞周期を促進するものと考えられる²⁹⁾。本研究の結果も、CRISPR/Cas9 による LT 遺伝子翻訳開始点下流への変異導入により MKL-1 細胞に組み込まれたプロウイルスの Rb binding domain の機能が不活性化され、細胞増殖の抑制を引き起こしたものと推測された。

CRISPR/Cas9 では本来の標的 DNA 以外の塩基配列を切断するオフターゲット効果が問題となる。本研究ではヒトゲノム中で sgRNA194 と最も相同性の高い 4 領域でオフターゲットの有無を調べたが、欠損および挿入は認められなかったことから sgRNA194 は LT に特異的なガイド RNA と考えられた。このようにヒトゲノムには存在しないプロウイルスの配列を標的とする CRISPR/Cas9 システムは有用な分子標的療法の候補になり得ると考えられる。

今回用いた方法では CRISPR/Cas9 の導入効率が 64% であり全ての細胞に CRISPR/Cas9 を導入できないことが課題として残った。CRISPR/Cas9 導入により MKL-1 細胞では細胞の増殖抑制がみられたが、培養日数の経過とともに細胞が増殖し始めた。これは変異 LT 遺伝子が失活されなかった細胞が増殖し始めたものと推測された。細胞増殖を十分に抑制するためには、より高い導入率を有する CRISPR/Cas9 システムの開発が望まれる。生体へのトランスフェクションの候補にはウイルスベクターやポリカチオンのポリマーを用いた方法が適していると考えられる。組み換え型レンチウイルスベクター (VSV-G 偽型) は広範囲の細胞への導入³³⁾可能であるが、宿主ゲノムへの組み込みが生じるため安全性に問題が残っている。アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) は病原性が少なく生体への導入に適したベクターと考えられている^{34, 35)}。最近、本邦で安全性の高い CRISPR/Cas9 用のセンダイウイルスを用いるベクターも開発されており、有用な CRISPR/Cas9 システムの搬送媒体として使用できる可能性がある。他の治療法として、メルケル細胞癌では腫瘍細胞の 66% が PD-L1 を発現しており、こ

れを標的として PD-L1 阻害剤による治療が検討されてきた³⁴⁾。本邦では 2016 年 12 月に抗 PD-L1 抗体薬であるバベンチオが希少疾病用医薬品に指定されたメルケル細胞癌に適応された唯一の治療薬となっている。しかしながら、本薬の奏効率は治療開始 6 ヶ月時点での 32% (完全奏効 9%, 部分奏効 23%) であり³²⁾、奏効が得られない症例については他の治療法が必要とされる。MCC 治療に CRISPR/Cas9 システムを応用して腫瘍を一過性に縮小させることができれば、外科的切除、分子標的療法、化学療法、チェックポイント阻害薬などの治療法と併用することが可能になるかもしれない。

5. 結論

sgRNA194/Cas9 を導入することにより MCC の LT 遺伝子に欠損を主とした変異の導入が可能であった。これにより LT 蛋白質の発現および細胞増殖抑制が認められた。

Authors' contributions

SH, MA, YA, HT, AO および KU が研究計画とデータの解釈に参与した。SH, MA, YA および KU がデータ分析を行った。全ての著者は論文原稿にコメントし、最終的に論文内容を承認した。

引用文献

- 1) Toker C (1972) . Trabecular carcinoma of the skin. Arch Dermatol, 10, 107-110.
- 2) Hodgson NC (2005) . Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. J Surg Onc, 89, 1-4.
- 3) Agelli M, Clegg LX (2003) . Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. J Am Acad Dermatol, 49, 832-841.
- 4) Becker JC, Kauczok CS, Ugurel S, et al (2008) . Merkel cell carcinoma: molecular pathogenesis, clinical features and therapy. J Dtsch Dermatol Ges, 6, 709-719.
- 5) Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, et al (2005) . Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic marker. Histopathology, 46, 622-634.
- 6) Schadendorf D, Lebbé C, Hausen AZ, et al (2017) . Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis,

- therapy and unmet medical needs. *Eur J Cancer*, 71, 53-69.
- 7) Heath M, Jaimes N, Lemos B, et al (2008) . Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol*, 58, 375-381.
 - 8) Tolstov YL, Knauer A, Chen JG, et al (2011) . Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults. *Emerg Infect Dis*, 17, 1371-1380.
 - 9) Lebbe C, Becker JC, Grob JJ, et al (2015) . Diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma. european consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*, 51, 2396-2403.
 - 10) Feng H, Shuda M, Chang Y, et al (2008) . Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 319, 1096-1100.
 - 11) Angermeyer S, Hesbacher S, Becker JC, et al (2013). Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma cells do not require expression of the viral small T antigen. *J Invest Dermatol*, 133, 2059-2064.
 - 12) Shuda M, Kwun HJ, Feng H, et al (2011) . Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest*, 121, 3623-3634.
 - 13) Shuda M, Guastafierro A, Geng X, et al (2015) . Merkel cell polyomavirus small T Antigen induces cancer and embryonic Merkel cell proliferation in a transgenic mouse model. *PLoS One*, 10.
 - 14) Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, et al (2015) . Merkel cell polyomavirus small T antigen is oncogenic in transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 135, 1415-1424.
 - 15) Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, et al (2017) .Merkel cell polyomavirus small T antigen initiates Merkel cell carcinoma-like tumor development in mice. *Cancer Res*, 77, 3151-3157.
 - 16) Kwun HJ, Shuda M, Feng H, et al (2013) . Merkel cell polyomavirus small T antigen controls viral replication and oncoprotein expression by targeting the cellular ubiquitin ligase SCFFbw7. *Cell Host Microbe*, 14, 125-135.
 - 17) Berrios C, Padi M, Keibler MA, et al (2016) . Merkel cell polyomavirus small T antigen promotes pro-glycolytic metabolic perturbations required for transformation. *PLoS Pathog*, 12.
 - 18) Shuda M, Feng H, Kwun HJ, et al (2008) . T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16272-16277.
 - 19) Li J, Wang X, Diaz J, et al (2013) . Merkel cell polyomavirus large T antigen disrupts host genomic integrity and inhibits cellular proliferation. *J Virol*, 87, 9173-9188.
 - 20) Theiss JM, Günther T, Alawi M, et al (2015) . A comprehensive analysis of replicating Merkel cell polyomavirus genomes delineates the viral transcription program and suggests a role for mcv-miR-M1 in episomal persistence. *PLoS Pathog*, 11, e1004974.
 - 21) Arora R, Chang Y, and Moore PS (2012) . MCV and Merkel cell carcinoma: a molecular success story. *Curr Opin Virol*, 2, 489-498.
 - 22) Hesbacher S, Pfitzer L, Wiedorfer K, et al (2016) . RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget*, 7, 32956-32968.
 - 23) Cheng J, Rozenblatt-Rosen O, Paulson K, et al (2013) . Merkel cell polyomavirus large T antigen has growth-promoting and inhibitory activities. *J Virol*, 87, 6118-6126.
 - 24) Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, et al (2009) . Merkel cells are essential for light-touch responses. *Science*, 324, 1580-1582.
 - 25) Kaae J, Hansen AV, Biggar RJ, et al (2010) . Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *J Natl Cancer Inst*, 102, 793-801.
 - 26) Wong SQ, Waldeck K, Vergara IA, et al (2015) . UV-associated mutations underlie the etiology of MCV-negative Merkel cell carcinomas. *Cancer Res*, 75, 5228-5234.
 - 27) González-Vela MDC, Curiel-Olmo S, Derdak S, et al (2017) . Shared oncogenic pathways implicated in both virus-positive and UV-induced Merkel cell carcinomas. *J Invest Dermatol*, 137, 197-206.
 - 28) Pasternak S, Carter MD, Ly TY, et al (2018) . Immunohistochemical profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*, 82, 232-238.

- 29) Houben R, Shuda M, Weinkam R, et al (2010) . Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol*, 84, 7064-7072.
- 30) Baker KE and Parker R (2004) . Nonsense-mediated mRNA decay: Terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 293-299.
- 31) Chang YF, Imam JS, and Wilkinson MF (2007) . The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 76, 51-74.
- 32) Kaufman HL, Russell J, Hamid O, et al (2016) . Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17, 1374-1385.
- 33) Cevher E, Sezer AD, and Çağlar EŞ (2012) . Gene delivery systems: recent progress in viral and non-viral therapy. *InTech*, p447-449.
- 34) Nayerossadat N, MaedehT, Ali PA (2012) . Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv BioMed Res*, 1, 1-11.
- 35) Teramoto S, Ishii T, and Matsuse T (2000) . Crisis of adenoviruses in human gene therapy. *Lancet*, 355, 1911-1912.