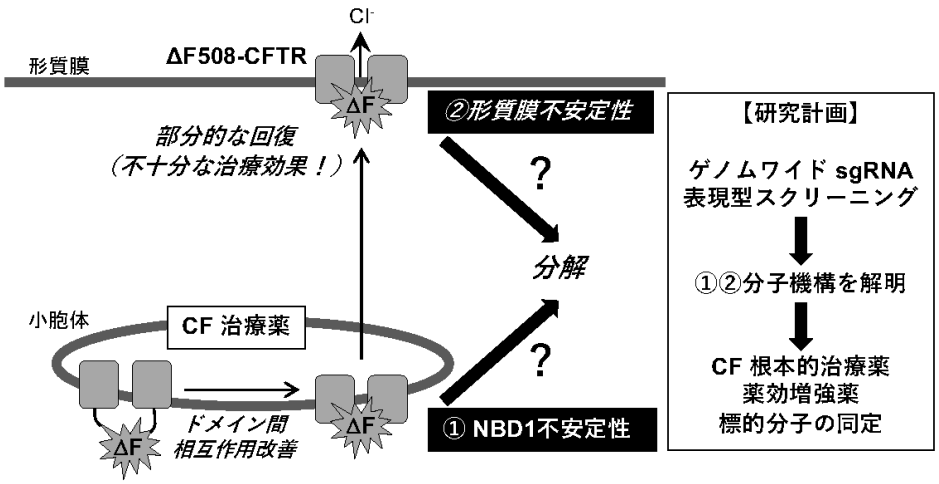
28　CFTR modulator の薬効増強薬標的分子の同定	沖米田　司

【目的】嚢胞性線維症（Cystic Fibrosis：CF、平均寿命 40 歳）は致死性の劣性遺伝病であり、塩素イオンチャネル CFTR 遺伝子変異（半数以上はΔF508 ホモ変異）により発症する単一遺伝病である。患者の寿命中央値は約 40 歳で、未だ根本治療法は確立されていない。近年上市された CF 治療剤（CFTR modulator）の有効性は低く、その薬効を増強するためには、ΔF508-CFTR の形質膜発現量を十分に改善する必要がある。これまでの我々の研究から、CF 治療剤の薬効を増強するためには、① ΔF508-NBD1 不安定性と② ΔF508-CFTR 形質膜不安定性を改善する必要がある（図）。本研究では、我々が独自に開発した形質膜 CFTR 簡便標識法と、比較的安価に入手可能となったプール型ゲノムワイド sgRNA ライブラリーを利用することで、CF 治療剤の薬効抑制に関わる分子の全貌解明を行った（図）。

【方法および結果】sgRNA 表現型スクリーニングを行うために、ΔF508-CFTR-3HA 及び Cas9 安定発現気道上皮細胞（CFBE-tet iΔF508 CFTR-3HA/Cas9）を樹立した。樹立した細胞における CF 治療剤の有効性を評価した結果、本細胞においても部分的な CF 治療剤の有効性を定量できた。CF 治療剤の薬効を増強する治療標的分子を同定するために、sgRNA 表現型スクリーニングを行った。本細胞に、ゲノムワイド sgRNA ライブラリー発現レンチウイルスを感染後、薬剤選抜し、sgRNA-mCherry 安定発現細胞を樹立した。樹立した細胞に CF 治療剤を 37℃で 2 日間処理後、細胞表面のΔF508-CFTR を蛍光標識し、フローサイトメトリーにより解析した。パイロットテストとして、全ゲノムの 10％をカバーする sgRNA ライブラリー発現細胞を用いた。その結果、CF 治療剤処理でΔF508- CFTR の形質膜発現が増加し、約 6%の細胞で劇的な増加が観察された。しかしながら、sgRNA 発現細胞において、CF 治療剤の有効性は低下し、今回テストした遺伝子集団においては、CF 治療剤の有効性を増強するものは得ることができなかった。

本研究の目的



28. CFTR modulator の薬効増強薬標的分子の同定

沖米田　司

関西学院大学 理工学部 生命医化学科

Key words：CFTR，嚢胞性線維症，CFTR modulator，ゲノムワイドスクリーニング

緒　言

嚢胞性線維症（Cystic Fibrosis：CF、平均寿命 40 歳）は日本での患者数 50 人未満の希少疾患（指定難病）で、全世界に約 8.5 万人の患者（米国に約 3 万人、欧州に約 4 万人）が存在する致死性の劣性遺伝病である。CF は塩素イオンチャネル CFTR 遺伝子変異により発症する単一遺伝病で、半数以上は CFTR ΔF508 ホモ変異を有する。現在、抗生物質や抗炎症薬による CF 対症療法が行われているが、患者の寿命中央値は約 40 歳で、未だ根本治療法は確立されていない。近年ΔF508 変異の CF 治療剤（CFTR modulator）が上市されたが、ΔF508-CFTR の形質膜発現量を十分に改善できず［1］、臨床での有効性は疑問視されている［2］。従って、CF 病態を著しく改善治療法を確立するためには、現在臨床で使用されている CF 治療剤の薬効を増強し、ΔF508-CFTR の形質膜発現量を十分に改善する必要がある。

これまでに我々は、ΔF508 変異が CFTR NBD1（ATP 結合ドメイン）不安定化とドメイン間相互作用阻害を誘導し、CFTR フォールディング異常を引き起こすことを証明した［3, 4］。また、CF 治療剤は CFTR ドメイン間相互作用を改善するが、NBD1 不安定性を改善できないことを明らかにした［5］。CF 治療剤はΔF508-CFTR の形質膜移行を促進し、そのイオンチャネル活性を亢進するが、形質膜からのΔF508-CFTR 分解を促進する［6］。従って、CF 治療剤の薬効を増強するためには、① ΔF508-NBD1 不安定性と② ΔF508-CFTR 形質膜不安定性を改善する必要がある（図 1）。我々はこれまでに、形質膜 CFTR 簡便標識法を確立し［7］、ΔF508-CFTR 形質膜発現増加を指標とした siRNA 表現型スクリーニング（約 600 遺伝子）により、ΔF508-CFTR 形質膜不安定性に関わるユビキチン化酵素を同定してきた［8, 9］。本研究では、我々が独自に開発した形質膜 CFTR 簡便標識法と、近年、比較的安価に入手可能となったプール型ゲノムワイド sgRNA ライブラリー（約 19,000 遺伝子）を利用することで、CF 治療剤の薬効抑制に関わる分子の全貌解明を行った（図 1）。

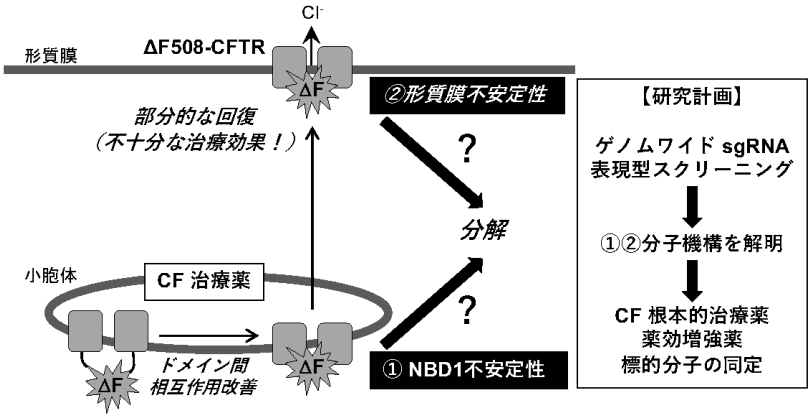


図 1. 本研究の目的

CF 治療剤の有効性を増強するためには、NBD1 不安定化と形質膜での CFTR 不安定化を改善する必要がある。本研究では、ゲノムワイド sgRNA スクリーニングにより、CF 治療剤の有効性を増強するアドオン薬の標的分子を同定する。

方法および結果

1. ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 安定発現細胞株の樹立

sgRNA 表現型スクリーニングを行うために、ΔF508-CFTR-3HA 及び Cas9 安定発現気道上皮細胞（CFBE）の樹立を行った。Doxycyline 誘導性 ΔF508-CFTR-3HA 安定発現 CFBE 細胞［8］に Cas9 発現レンチウイルスを感染（MOI 7.5）させ、10 日間の薬剤選抜（Blastcidin 10μg/ml）後、細胞のクローニングを行い、ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 安定共発現 CFBE 細胞を樹立した。ウエスタンブロットを行った結果、ΔF508-CFTR-3HA の発現と共に Cas9 タンパク質の発現を確認した（図 2A）。免疫蛍光染色法の結果、ΔF508-CFTR-3HA と Cas9 タンパク質の共発現を確認した（図 2B）。さらに、ΔF508-CFTR の表現型が保存されているか確認するために、ΔF508-CFTR の成熟型および形質膜発現を誘導する低温培養（Rescue 処理、26℃）を 2 日間行った。その結果、Rescue 処理により、本細胞においてもΔF508-CFTR の成熟化（図 2A）と形質膜発現が促進された（図 2B）。

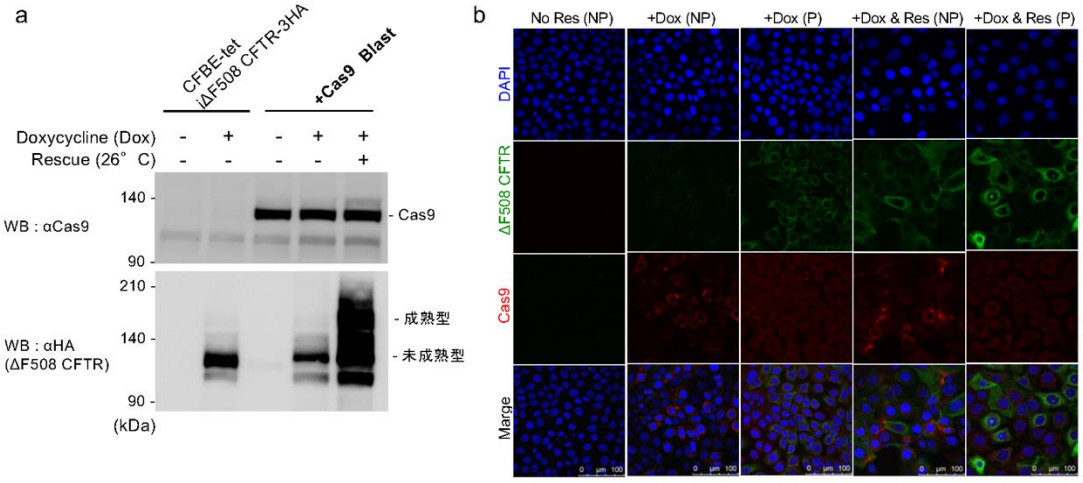


図 2. ΔF508-CFTR および Cas9 安定発現ヒト気道上皮細胞株（CFBE-tet i ΔF508-CFTR-3HA/Cas9）の樹立

a) Cas9 およびΔF508-CFTR 安定発現をウエスタンブロットで確認した。

b) 免疫蛍光染色による共発現細胞の確認. ΔF508 -CFTR 発現は Doxycycline（1μg/ml）4 日間処理により誘導した。また、ΔF508-CFTR 形質膜発現を低温培養（Rescue：26℃、2 日間）により誘導した。細胞固定後、膜透過（P）または膜非透過（NP）条件で細胞内または細胞表面のΔF508-CFTR を染色した（スケールバー：100μm）。

2. ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 安定発現細胞株における CF 治療剤の効果

樹立した CFBE-tetiΔF508-CFTR-3HA/Cas9 において、現在、臨床で使用されている CF 治療剤が有効であるかΔF508CFTR 成熟化および形質膜発現を指標に評価した。CF 治療剤として、VX-809（lumacaftor）、VX-661（tezacaftor）、VX-445（elexacaftor）、VX-770（ivacaftor）を使用した。VX-809 と VX-770 の配合薬は Orkambi（2015 年 FDA 認可）として、VX-661、VX-445、VX-770 の配合薬は Tricafta（2019 年 FDA 認可）として臨床応用されている。樹立した細胞にこれらの CF 治療剤を 2 日間処理し、ΔF508CFTR 成熟化をウエスタンブロット法で解析した結果、ΔF508CFTR の成熟化が確認された（図 3）。また、CF 治療剤を処理後、細胞表面に出現したΔF508-CFTR-3HA を HA 抗体および AlexaFluorPlus488 抗体で蛍光標識し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、VX-661、VX-445、VX-770 処理でΔF508-CFTR の形質膜発現が増加し、約 11%の細胞で劇的な増加が観察された（図 4）。ΔF508-CFTR 形質膜発現を強制的に促進する低温培養（Rescue 処理、26℃、2 日間）も同様の効果が見られ、また、ΔF508-CFTR 形質膜発現を野生型レベル近くまで回復する低温培養と VX-809 併用処理では、約 50%の細胞で劇的な形質膜ΔF508-CFTR 発現増加が観察された（図 4）。以上の結果より、CFBE-tetiΔF508-CFTR-3HA/Cas9 において、部分的な CF 治療剤（Tricafta）の薬効を定量する評価系の確立に成功した。

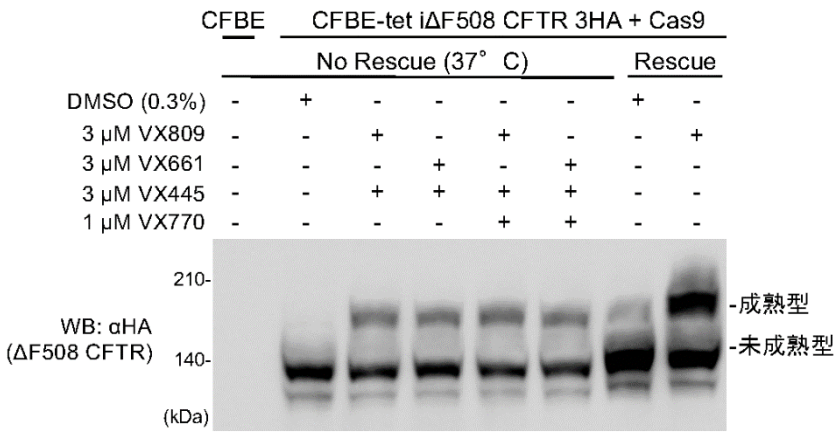


図 3. CFBE-teti ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 細胞における CF 治療剤の効果

CF 治療剤（VX-809、VX-661、VX-445、VX-770）を 37℃で 2 日間処理後、ΔF508-CFTR 発現量をウエスタンブロット法で解析した。ΔF508-CFTR 発現は Doxycycline（1μg/ml）4 日間処理により誘導した。また、ΔF508-CFTR 形質膜発現を低温培養（Rescue:26℃、2 日間）により強制的に促進した。

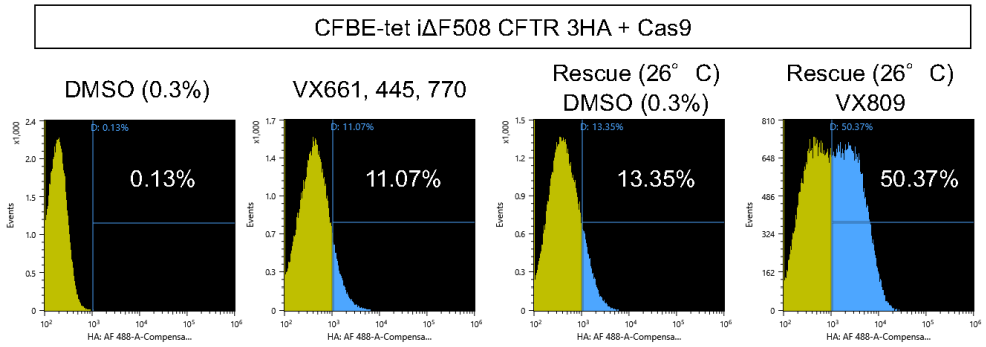


図 4. フローサイトメトリー解析による CF 治療剤効果の評価

CFBE-teti ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 細胞に CF 治療剤（VX-661、VX-445、VX-770）を 37℃で 2 日間処理後、HA 抗体および AlexaFluorPlus488 抗体で細胞表面の ΔF508-CFTR を蛍光標識後、フローサイトメトリーにより解析した。ΔF508-CFTR 発現は Doxycycline（1μg/ml）4 日間処理により誘導した。また、ΔF508-CFTR 形質膜発現を低温培養（Rescue：26℃、2 日間）と CF 治療剤 VX809 併用処理により強制的に誘導した。図中の数字は、形質膜 ΔF508-CFTR 陽性細胞の割合を示す。

3. ΔF508-CFTR 膜発現増加を指標としたゲノムワイド sgRNA 表現型スクリーニング

CF 治療剤（Tricafta）の有効性を増強する治療標的分子を同定するために、sgRNA 表現型スクリーニングを行った。まず、樹立した CFBE-teti ΔF508-CFTR-3HA/Cas9 細胞（1×10^8個）にゲノムワイド sgRNA ライブラリー（19,114 遺伝子、76,612 種 sgRNA-mCherry、Guide-itCRISPRGenome-WidesgRNALibrarySystem、Takara）発現レンチウイルスを感染させた。多重感染を防ぐために、レンチウイルス感染は MOI 0.4 で行った。感染後、薬剤選抜（200μg/ml HygromycinB）を 10 日間行い、sgRNA-mCherry 安定発現細胞を樹立した。樹立した細胞を免疫蛍光染色法で確認した結果、ΔF508-CFTR-3HA と sgRNA-mCherry の共発現が確認できた（図 5）。

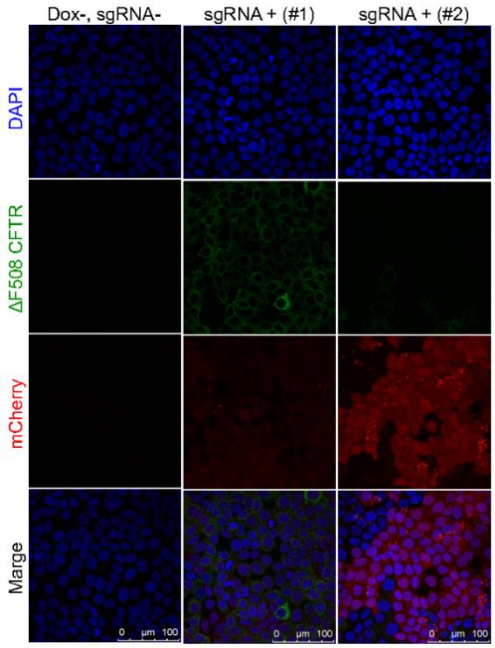


図 5. sgRNA-mCherry-hyg 安定発現 CFBE 細胞の樹立

CFBE-tet iΔF508-CFTR-3HA/Cas9 細胞に sgRNA-mCherry 発現レンチウイルスを感染し、ハイグロマイシン選抜後、安定発現細胞を樹立した。ΔF508CFTR 発現を Doxycycline（1μg/ml）4 日間処理により誘導後、細胞を固定し、HA 抗体および AlexaFlur488 抗体で ΔF508-CFTR を蛍光標識した。ΔF508-CFTR と sgRNA-mCherry 共発現を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。#1、#2 は 2 つの視野を示す（スケールバー：100μm）。

4. CF 治療剤の薬効を増強する sgRNA の同定

上記で樹立した CFBE-tet iΔF508-CFTR-3HA/Cas9/sgRNA-mCherry 細胞に CF 治療剤（VX-661、VX-445、VX-770）を 37℃で 2 日間処理後、HA 抗体および AlexaFluorPlus488 抗体で細胞表面の ΔF508CFTR を蛍光標識し、フローサイトメトリーにより解析した。パイロットテストとして、全ゲノムの 10%をカバーする sgRNA ライブラリーを用いた。その結果、CF 治療剤処理で ΔF508-CFTR の形質膜発現が増加し、約 6%の細胞で劇的な増加が観察された（図 4）。しかしながら、sgRNA 発現細胞において、CF 治療剤の有効性は低下し、今回テストした遺伝子集団においては、CF 治療剤の有効性を増強するものは得ることができなかった（図 6）。

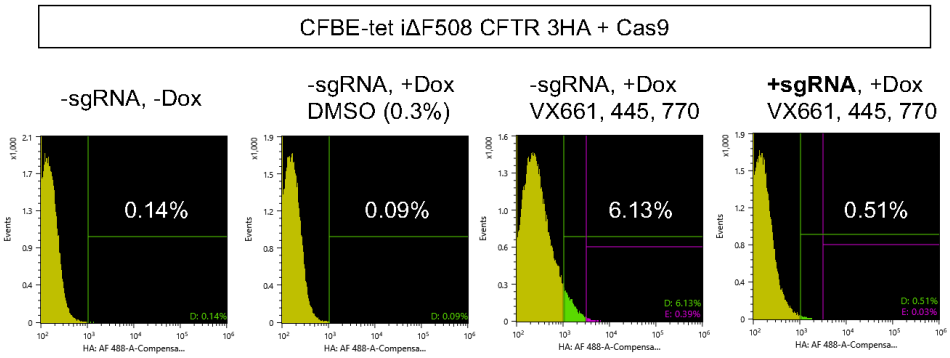


図 6. CF 治療剤効果に影響する遺伝子の sgRNA スクリーニング

CFBE-tetiΔF508-CFTR-3HA/Cas9/sgRNA-mCherry 細胞に CF 治療剤（VX-661、VX-445、VX7-70）を 37℃で 2 日間処理後、HA 抗体および AlexaFluorPlus488 抗体で細胞表面の ΔF508-CFTR を蛍光標識後、フローサイトメトリーにより解析した。パイロットテストとして、本サンプルでは全ゲノムの 10%をカバーする sgRNA ライブラリーを用いた。図中の数字は、形質膜ΔF508-CFTR 陽性細胞の割合を示す。

考　察

本研究により、嚢胞性線維症の原因タンパク質ΔF508-CFTRの形質膜発現を指標としたゲノムワイドsgRNA表現型スクリーニングを実施可能な細胞モデルの確立に成功した。本評価系は、CF治療剤の有効性を増強するアドオン薬の治療標的分子の探索だけではなく、あまり解析が進んでいない形質膜タンパク質品質管理機構の解明にも大きく貢献すると考えられる。本研究では、時間的制限のため、全ゲノムの10%遺伝子のみをパイロット試験として実施し、残念ながらCF治療剤アドオン薬の標的分子を同定することはできなかった。今後、全ゲノムをカバーするsgRNAスクリーニングを実施することで、CF治療剤アドオン薬の有望な治療標的分子を同定したい。

文　献

1) Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P. D., Burton, B., Stack, J. H., Straley, K. S., Decker, C. J., Miller, M., McCartney, J., Olson, E. R., Wine, J. J., Frizzell, R. A., Ashlock, M., and Negulescu, P. A.. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 15;108(46):18843-8. doi: 10.1073/pnas.1105787108. Epub 2011 Oct 5.

2) Wainwright, C. E., Elborn, J. S., Ramsey, B. W., Marigowda, G., Huang, X., Cipolli, M., Colombo, C., Davies, J. C., De Boeck, K., Flume, P. A., Konstan, M. W., McColley, S. A., McCoy, K., McKone, E. F., Munck, A., Ratjen, F., Rowe, S. M., Waltz, D., Boyle, M. P., Group, T. S., and Group, T. S.. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. N Engl J Med. 2015 Jul 16;373(3):220-31. doi: 10.1056/NEJMoa1409547. Epub 2015 May 17.

3) Rabeh, W. M., Bossard, F., Xu, H., Okiyoneda, T., Bagdany, M., Mulvihill, C. M., Du, K., di Bernardo, S., Liu, Y., Konermann, L., Roldan, A., and Lukacs, G. L.. Correction of Both NBD1 Energetics and Domain Interface Is Required to Restore Delta F508 CFTR Folding and Function. Cell. 2012 Jan 20;148(1-2):150-63. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.024.

4) Okiyoneda, T., and Lukacs, G. L.. Fixing cystic fibrosis by correcting CFTR domain assembly. J Cell Biol. 2012 Oct 15;199(2):199-204. doi: 10.1083/jcb.201208083.

5) Okiyoneda, T., Veit, G., Dekkers, J. F., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., Roldan, A., Verkman, A. S., Kurth, M., Simon, A., Hegedus, T., Beekman, J. M., and Lukacs, G. L.. Mechanism-based corrector combination restores Delta F508-CFTR folding and function. Nat Chem Biol. 2013 Jul;9(7):444-54. doi: 10.1038/nchembio.1253. Epub 2013 May 12.

6) Veit, G., Avramescu, R. G., Perdomo, D., Phuan, P. W., Bagdany, M., Apaja, P. M., Borot, F., Szollosi, D., Wu, Y. S., Finkbeiner, W. E., Hegedus, T., Verkman, A. S., and Lukacs, G. L.. Some gating potentiators, including VX-770, diminish ΔF508-CFTR functional expression. Sci Transl Med. 2014 Jul 23;6(246):246ra97. doi: 10.1126/scitranslmed.3008889.

7) Peters, K. W., Okiyoneda, T., Balch, W. E., Braakman, I., Brodsky, J. L., Guggino, W. B., Penland, C. M., Pollard, H. B., Sorscher, E. J., Skach, W. R., Thomas, P. J., Lukacs, G. L., and Frizzell, R. A., CFTR Folding Consortium: methods available for studies of CFTR folding and correction. Methods Mol Biol. 2011;742:335-53. doi: 10.1007/978-1-61779-120-8_20.

8) Okiyoneda, T., Veit, G., Sakai, R., Aki, M., Fujihara, T., Higashi, M., Susuki-Miyata, S., Miyata, M., Fukuda, N., Yoshida, A., Xu, H., Apaja, P. M., and Lukacs, G. L.. Chaperone-Independent Peripheral Quality Control of CFTR by RFFL E3 Ligase. Dev Cell. 2018 Mar 26;44(6):694-708.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.02.001. Epub 2018 Mar 1.

9) Okiyoneda, T., Barriere, H., Bagdany, M., Rabeh, W. M., Du, K., Hoehfeld, J., Young, J. C., and Lukacs, G. L.. Peripheral Protein Quality Control Removes Unfolded CFTR from the Plasma Membrane. Science. 2010 Aug 13;329(5993):805-10. doi: 10.1126/science.1191542. Epub 2010 Jul 1.