

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

2025 年 6 月 8 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

職 名 准教授

氏 名 成瀬 智恵

助 成 の 種 類	令和6年度 ・ 研究活動推進助成		
申請時の科研費 研究 課 題 名	タンパク質ノックダウン法を用いた時期特異的PD-1除去によるがん治療モデルの開発		
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	血液細胞や培養細胞の遊走に関わるCXCR4の糖鎖修飾部位の解析		
助成金充当に関 わる共同研究者	PAN XUCHI(京都大学医学研究科附属動物実験施設)		
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 1. Naruse C, Ishibashi O, Ohgushi M, Imai H, Matsuzaki T, Pan X, Miyazaki M, Shidahara Y, Shirakawa Y, Sugiyama F, Asano M. Differential substrate degradation by super-degron: EGFP in wild-type mouse cells, PD-1 requires CRBN humanization. iScience in press 2. Pan X, Naruse C, Matsuzaki T, Ishibashi O, Sugihara K, Asada H, Asano M. Critical role of the potential o-linked glycosylation sites of CXCR4 in cell migration and bone marrow homing of hematopoietic stem progenitor cells. Stem Cells, sxaf025 2025.		
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,500,000 円	
	使用した助成金額	1,500,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額
		日本分子生物学会会費	6,500
		実験動物梱包輸送費	28,710
		PrimeScript RT reagent	113,014
		カクタス英文校正	81,496
		抗PD-1抗体	68,299
		コントロール抗体	66,209
		プラスチックプレート	71,467
		シーケンス外部受託	5,259
		シーケンス外部受託	52,800
抗ORC1抗体	23,705		
シーケンス外部受託	36,438		
細胞培養培地	62,315		

	カクタス英文校正	3,236
	Stem Cells 掲載料	298,366
	統計ソフト	37,008
	エタノール	2,119
	MacBook Air	209,800
	iScience 掲載料	333,259
当財団の助成について	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費が獲得できなかったため、この助成金をいただくことができなかったら、論文発表をすることができなくなるところでしたが、助成金のおかげで研究費および論文掲載料を支払うことができました。また、論文発表ができないと科研費が獲得できないという負のループに入ることなく、研究を続けられたことに感謝しております。論文掲載までに時間がかかってしまい、年度を超えてしまいましたが、おかげさまで学生の学位論文となる論文も出版することができました。誠にありがとうございました。</p>	

成果の概要 / 成瀬智恵

1. 背景

がんの治療に関する研究は近年大きく進歩しており、特に、元来生物に備わる免疫力を最大限に利用してがんを排除しようとする免疫療法が注目されています。免疫機能のブレーキの役割を持つ PD-1 を阻害することで、免疫細胞によるがん細胞の傷害活性を高めるがん免疫療法は、高い治療効果が認められますが、自己免疫疾患を発症する例があります。そこで、免疫細胞上の PD-1 を必要な期間だけ分解できるようなシステムを構築すれば、この問題を解決できる新しい治療法開発につながるのではないかと考えました。

そこで、我々はデグロンシステムに注目しました。デグロンシステムは、細胞が本来持つタンパク質分解システムであり、これまでも植物のオーキシンを添加する AID システムなど、デグロンシステムを利用した様々なタンパク質分解法が世界的に開発され、培養細胞や体外での研究に広く用いられています。近年、サリドマイド類似化合物によってタンパク質分解が誘導されるシステムがよく使用されるようになっていますが、有用な実験動物であるマウスでは残念ながら効果がないと考えられていました。

2. 研究手法・成果

マウスの PD-1 にタンパク質を分解するための目印である super degon タグを融合させるため、遺伝子組換え技術を用いて super degon タグ遺伝子を蛍光タンパク質 EGFP やマウス PD-1 遺伝子の後ろに挿入しました。また、野生型マウス細胞とタンパク質分解に必要な CEREBLON というタンパク質をヒト化したマウス細胞の両方で EGFP および PD-1 を分解できるかどうか比較しました。その結果、野生型マウス細胞でも EGFP は分解できましたが、PD-1 は CEREBLON ヒト化マウスでないと分解できないことがわかりました。よって、タンパク質によって分解に適した条件が異なることがわかりました。super degon タグを融合したタンパク質はサリドマイド類似化合物より分解されますが、調べた化合物の中では iberdomide というサリドマイド類似物質が最も効果的であることがわかりました。PD-1-super degon ノックインマウスの免疫細胞を培養して、iberdomide を加えると、がん免疫において重要な役割をしている T 細胞で PD-1 が減少しました。また、MC-38 大腸がん細胞株を移植し、ノックインマウスに薬剤を投与したところ、PD-1 の発現が抑制され、野生型マウスや薬剤を投与しないノックインマウスと比べて、がん細胞の増殖が抑制されました。さらに、抗 PD-1 抗体による治療よりも、PD-1 発現抑制の方が、がんの成長抑制効果が早く現れることがわかりました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究により、必要な時だけ特定のタンパク質を分解して減らすことのできるデグロンシステムによって、マウス生体内の内在性タンパク質を機能阻害できることを示しました。また、タンパク質の種類によっては野生型マウスにも適用可能であることが示唆されました。本システムは、様々な生物現象や病気の治療法の研究などに応用することが期待できます。

以前我々が作製した SMASh デグロンシステムによる PD-1 ノックダウンを試みたマウスでは、薬剤を投与する前から PD-1 の分解がある程度促進されており、加齢個体で自己免疫疾患を発症してしまいました。今回開発したマウスは、薬剤投与のない時には野生型と比較して 70%程度の発現となるものの、自己免疫疾患等の異常は認められませんでしたので、免疫系を含め、広く使用することが可能と考えられます。