

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07224

研究課題名(和文) Myc誘導性リンパ腫における増悪化機構の統合的解明と制御

研究課題名(英文) Integrated elucidation and control of malignant mechanism in MYC-induced lymphoma

研究代表者

杉原 英志 (Sugihara, Eiji)

藤田医科大学・共同利用研究設備サポートセンター・准教授

研究者番号：50464996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非ホジキンリンパ腫はがん遺伝子MYCが転座などの異常があると悪性度が高く、特にBCL2と同時に高発現であると高い難治性を示し、非常に予後が悪くなるため、MYC異常リンパ腫に対する治療法の開発は重要な課題である。本研究ではMYCによって発症する3種類のリンパ腫マウスモデルを用いて遺伝発現プロファイリング、阻害剤スクリーニング、全ゲノムシーケンス解析を実施した。その結果、MYCによって制御される未報告の遺伝子やリンパ腫形成に関与する遺伝子を統合的に同定できた。また、これらの遺伝子はリンパ腫患者の予後に影響を及ぼすことを明らかにした。さらにAIDはリンパ腫の細胞死抑制の変異を導入する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMYCを直接的または間接的に阻害する薬剤の開発が進められてきたが、未だ臨床試験に成功した薬剤はない。本研究結果により新たに同定したMYCが制御する遺伝子やMYCによるリンパ腫形成に関与する遺伝子はMYC異常の難治性リンパ腫に対する阻害剤開発の標的分子になる可能性が高い。またMYCは他の臓器のがんの発症・進展にも関わることが報告されているため、今後、本研究結果が他のがん種へ展開することで波及効果も得られると大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aggressive types of non-Hodgkin's lymphoma, including Burkitt lymphoma and diffuse large B cell lymphoma, is a hematopoietic tumor with a high frequency, and the prognosis is poor if the oncogene MYC is highly expressed due to abnormalities such as translocation and mutation. High expression at the same time as BCL2 shows high refractory and extremely poor prognosis, so the development of a treatment method for MYC abnormal lymphoma is a critical issue. In this study, we conducted comprehensive gene expression profiling, inhibitor screening and whole-genome sequencing using three types of lymphoma mouse models driven by MYC. We identified unreported genes regulated by MYC and involved in lymphoma formation. Database-based analysis revealed that these genes affect the prognosis of lymphoma patients, suggesting functional involvement in lymphoma development. Furthermore, under certain conditions, we showed the possibility of AID introducing mutations that suppress cell death.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：MYC マウスモデル リンパ腫 AID

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍で最も頻度が高い非ホジキンリンパ腫は胚中心B細胞を起源とする成熟B細胞型のリンパ腫であり、特にがん遺伝子MYCが高発現であると高い増悪性を示すことが報告されている(Ott, *Hematology*, 2013)。その中でパーキットリンパ腫においてはMYCと免疫グロブリン重鎖遺伝子の相互転座が90%以上と非常に高頻度での異常が報告され、MYCががんを引き起こす原因遺伝子となっている。2016年のWHO分類改訂にて新たに「High grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements」というdouble-hit lymphoma (DHL) と呼ばれるリンパ腫が追加された。DHLは主にMYCとBCL2遺伝子の転座が主要であり、また両者の高発現が見られるDouble-expressor lymphomaと呼ばれるDHLに類似したリンパ腫も報告され、合わせるとNHLの一つである「びまん性大細胞型B細胞リンパ腫」において約30%もの割合になる(Sesques, *Blood*, 2017)。また、前駆B細胞型のリンパ腫においてもMYCの免疫グロブリン遺伝子との転座が報告されている。これらのリンパ腫はリツキサンを始めとした近年の治療法改善にもかかわらず、高い治療抵抗性・再発性を示し、きわめて予後不良であるため、DHLを含むMYC異常のリンパ腫に特化した治療法の創出は非常に重要な課題であった。

研究代表者はこれまでex vivoを基盤とした急性リンパ芽球性白血病、皮膚リンパ腫マウスモデルなどの造血器腫瘍モデルを構築し研究を推進してきた(*Blood*, 2017, *Nat Med* 2015など7報)。すでに構築している前駆B細胞リンパ腫に加えて、胚中心B細胞をex vivoで培養しMYCあるいはMYC-BCL2を導入・移植することでMYC高発現リンパ腫、DHL様の新規成熟B細胞リンパ腫モデルを構築した。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が上述のように構築してきたMYCをドライバーとしたB細胞リンパ腫マウスモデル及びヒトリンパ腫細胞株を用いて、MYC異常によって引き起こされるリンパ腫増悪化の分子機構を様々な角度から統合的に解明することを目的とし、明確な分子基盤に立脚したMYC異常の悪性リンパ腫の新規治療法を考案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス前駆B細胞リンパ腫(MYC-LBL)モデルの作製

*Cdkn2a*欠損マウス骨髄より前駆B細胞を培養し、レトロウイルスベクターにてMYCを導入した。その後IL7を添加した培地にて培養し、半致死量のX線照射した同種レシピエントマウスへ尾静脈から移植した。およそ1~2か月で前駆B細胞型のリンパ腫が形成されるため、リンパ節よりリンパ腫細胞を採取し、実験に使用した。

(2) 成熟B細胞型のリンパ腫モデルの作製

*Cdkn2a*欠損マウス脾臓よりB細胞を磁気ビーズにて分離し、IL4及びCD40抗体を添加した培地にて培養した。その後、レトロウイルスベクターにてMYCもしくはMYCとBCL2をP2A(自己切断ペプチド)で結合した遺伝子を導入した。その後、半致死量のX線照射を行った同種レシピエントマウスへ腹腔内より移植した。MYC単独発現のB細胞を移植したマウスからはおよそ60%程度で成熟B細胞型のリンパ腫(MYC-L)がおよそ2か月で形成された。一方、MYCとBCL2を発現したB細胞を移植したマウスからは100%の割合で成熟B細胞リンパ腫(DHL)をおよそ1か月で形成した。それぞれのマウスのリンパ節または脾臓からリンパ腫細胞を採取・培養し、本研究に使用した。

(3) 網羅的遺伝子発現解析、ゲノム解析

前駆B細胞型のリンパ腫と正常B前駆細胞をマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析を実施し、発現差異解析及びGSEA(Gene Set Enrichment Analysis)を行った。また、マウス成熟B細胞リンパ腫モデルを用いて次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンス解析、全ゲノムシーケンス解析を実施し変異検出を行った。

(4) 薬剤スクリーニング、増殖・細胞死アッセイ

分子プロファイリング支援活動より提供された分子阻害薬を用いてスクリーニングを行った。効果測定にはCell Titer Glo試薬を用いて実施した。また、抗がん剤処理による効果測定にはセルカウンター及びAnnexin V assayによるアポトーシス検出によって実施した。

4. 研究成果

(1) MYC誘導性前駆Bリンパ芽球性リンパ腫で高発現の遺伝子の同定

MYCは主に転写因子としての働きがあり、標的遺伝子の転写量を調節することで機能を発揮する。そこで前駆Bリンパ芽球性リンパ腫モデル(MYC-LBL)において特徴的な遺伝子発現を解明するため、正常前駆B細胞と比較した網羅的遺伝子発現解析を実施した。GSEA解析の結果、これまで報告されているMYCの標的遺伝子群の発現が有意にMYC-LBLにおいて確認された(図1A)。ま

たミトコンドリア及びリボソーム RNA 合成に関わる遺伝子群が高いことが分かった。さらに発現差異解析で MYC-LBL で高発現の遺伝子を絞り込むとこれまで MYC の標的として報告されていない興味深い遺伝子がいくつか同定され、リンパ腫の発症・悪性化に強く関与する可能性が示唆された(図 1B)。次にヒトリンパ腫細胞株でこれらの遺伝子が発現しているのか定量的 PCR にて確認したところ、MYC 高発現株で高い発現が確認された一方、MYC 低発現株でも高発現が見出された。これはマウスとヒトの分子病態の違いや腫瘍形成過程で MYC から独立した発現制御を受けた可能性を示唆した。また MYC 標的の遺伝子発現は一部の造血系腫瘍で予後不良との有意な相関がみられ、発がんや腫瘍増悪化に大きく寄与していることが考えられた。

図1



(2) MYC 誘導性成熟 B 細胞型リンパ腫における分子標的剤スクリーニング

まず、構築した MYC 単独発現リンパ腫細胞 (MYC-L) と MYC と BCL を同時発現のリンパ腫 (DHL) の生物学的特性を比較したところ、DHL 細胞は MYC-L と比較して長期生存能を持ち、非ホジキンリンパ腫の標準治療薬である doxorubicin に対して非常に高い耐性を持つことが確認された。そこで DHL 細胞に対して効果的な阻害剤を同定するため、分子プロファイリング支援活動より提供された小規模な分子阻害剤のスクリーニングを実施したところ、BCL2 阻害剤や MYC の標的分子の阻害剤に加え、これまで報告のない分子の阻害剤に高い感受性を示した。その中でヒストンメチルトランスフェラーゼである G9a に対する阻害剤は非常に高い感受性を示した。G9a は MYC が誘導する転写抑制機構で重要な役割を持つ分子であり、本実験と同時期に論文が発表された (Tu WB et al Cancer Cell 2018)。この結果から DHL 細胞は MYC による発がん機構の解明や難治性リンパ腫に対する薬剤スクリーニングに優れたモデル細胞となり得ることが示された。

(3) MYC 誘導性リンパ腫の全ゲノム解析

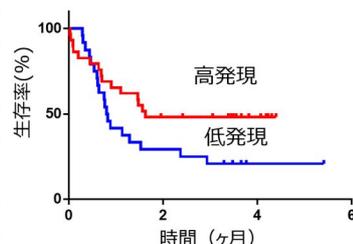
過去の解析で MYC-L は単クローン性での増殖が確認されたため、MYC が誘導する発がん過程に寄与する遺伝子の同定を目的とし、全ゲノムシーケンス解析を実施した。その結果、9 匹由来のリンパ腫クローンにおいて 9 匹全てのクローンで機能喪失型変異を持つ遺伝子を 2 個、8 匹のクローンで機能喪失型変異を持つ遺伝子を 1 個、その他 7 匹、6 匹、5 匹と共通の機能喪失型の変異を持つ遺伝子を同定した(図 2A)。そこで公共データベースの発現プロファイルを用いてリンパ腫患者の生存期間と同定した遺伝子の発現について相関解析を行ったところ、3 個の遺伝子において低発現ほど有意と予後不良と相関することを見出した(図 2B)。この結果から MYC によるリンパ腫誘導には本研究で同定した遺伝子に変異が生じ、機能が喪失することが重要であり、再度活性化することができれば悪性リンパ腫に対する新たな治療法となる可能性が考えられた。

図2

(A) 全ゲノムシーケンス解析の結果

No.	遺伝子名	変異タイプ	変異率(%)
1	<i>Gene A</i>	frameshift_variant	100
2	<i>Gene B</i>	splice_donor_variant &intron_variant	100
3	<i>Gene C</i>	frameshift_variant	89
4	<i>Gene D</i>	stop_gained	78
5	<i>Gene E</i>	stop_gained	78
6	<i>Gene F</i>	frameshift_variant	67
7	<i>Gene G</i>	stop_gained	67

(B) 遺伝子Aの発現とリンパ腫患者の予後



(4) シチジンデアミナーゼ AID による MYC 誘導性リンパ腫悪性化への関与

成熟 B リンパ腫において発症・悪性化機序の一つとして考えられるシチジンデアミナーゼに関する検討を実施した。シチジンデアミナーゼファミリーの一つである AID は Fas によるアポトーシス誘導に対して抵抗性を持つ細胞で高発現であることを明らかにしているが、その原因を調べるため全エクソンシーケンス解析を実施した。その結果、Fas のアポトーシスシグナルに重要な death ドメインをコードする領域の塩基 C が T へと置換していることを見出した。興味深いことに全てのクローンにおいてこの death ドメイン領域に変異が収束することが分かり、これらの変異の結果アポトーシス抵抗性を示すことが分かった。つまり、AID による積極的な変異導入がアポトーシス抵抗性を誘導する機構が存在することが示唆された。AID による遺伝子変異導入が薬剤耐性の獲得に繋がるのかどうか、AID 高発現のマウスリンパ腫細胞に対して doxorubicin を用いて検討を実施した。その結果、長期に処理しても薬剤耐性を獲得した細胞を得ることができなかった。これはつまり、AID が限られた条件下でのみ変異を誘導することが示唆された。さらに AID の発現増加がリンパ腫の進展に影響を及ぼすのかどうか、リンパ腫細胞に AID を発現させたところ、細胞死が強く誘導されることが分かった。この結果から AID の発現量は一定に制御されることがリンパ腫にとって非常に重要で過剰な発現は重度の DNA 損傷を引き起こし、アポトーシスが誘導されることが示唆された。従って AID の過剰な活性化は変異誘導より先にアポトーシスを誘導することから逆に新たな治療法となる可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sugihara Eiji, Hashimoto Norisato, Osuka Satoru, Shimizu Takatsune, Ueno Sayaka, Okazaki Shogo, Yaguchi Tomonori, Kawakami Yutaka, Kosaki Kenjiro, Sato Taka-Aki, Okamoto Shinichiro, Saya Hideyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 The Inhibitor of Apoptosis Protein Livin Confers Resistance to Fas-Mediated Immune Cytotoxicity in Refractory Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4439 ~ 4450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-3993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ochi Yotaro, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Cohesin?RUNX1 Deficiency Synergistically Perturbs Chromatin Looping and Causes Myelodysplastic Syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 836 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-19-0982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Nobuhiro, Nobusue Hiroyuki, Shimizu Takatsune, Sugihara Eiji, Yamaguchi-Iwai Sayaka, Onishi Nobuyuki, Kunitomi Haruko, Kuroda Tatsuo, Saya Hideyuki	4. 巻 79
2. 論文標題 ROCK Inhibition Induces Terminal Adipocyte Differentiation and Suppresses Tumorigenesis in Chemoresistant Osteosarcoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3088 ~ 3099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-2693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakiuchi Nobuyuki et al.	4. 巻 577
2. 論文標題 Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 260 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1856-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamai Minori, Inukai Takeshi, Kojika Satoru, Abe Masako, Kagami Keiko, Harama Daisuke, Shinohara Tamao, Watanabe Atsushi, Oshiro Hiroko, Akahane Koshi, Goi Kumiko, Sugihara Eiji, Nakada Shinichiro, Sugita Kanji	4. 巻 8
2. 論文標題 T315I mutation of BCR-ABL1 into human Philadelphia chromosome-positive leukemia cell lines by homologous recombination using the CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27767-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Semba Takashi, Sugihara Eiji, Kamoshita Nagisa, Ueno Sayaka, Fukuda Keitaro, Yoshino Masafumi, Takao Kazumasa, Yoshikawa Kazunori, Izuhara Kenji, Arima Yoshimi, Suzuki Makoto, Saya Hideyuki	4. 巻 109
2. 論文標題 Periostin antisense oligonucleotide suppresses bleomycin-induced formation of a lung premetastatic niche for melanoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yoshiyuki, Onishi Nobuyuki, Takami Hiroshi, Seishima Ryo, Inoue Hiroyoshi, Hirata Yuki, Kameyama Kaori, Tsuchihashi Kenji, Sugihara Eiji, Uchino Shinya, Ito Koichi, Kawakubo Hirofumi, Takeuchi Hiroya, Kitagawa Yuko, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 497
2. 論文標題 Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 783 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Meixian, Inukai Takeshi, Miyake Kunio, Tanaka Yoichi, Kagami Keiko, Abe Masako, Goto Hiroaki, Minegishi Masayoshi, Iwamoto Shotaro, Sugihara Eiji, Watanabe Atsushi, Somazu Shinpei, Shinohara Tamao, Oshiro Hiroko, Akahane Koshi, Goi Kumiko, Sugita Kanji	4. 巻 7
2. 論文標題 Clofarabine exerts antileukemic activity against cytarabine-resistant B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with low deoxycytidine kinase expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 2. Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Ueno S, Shimizu T, Okamoto S, Saya H.
2. 発表標題 BRD4 regulates Livin expression and thereby confers resistance to Fas-mediated immune cytotoxicity in aggressive B cell lymphoma.
3. 学会等名 AACR annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原 英志、佐谷秀行
2. 発表標題 Mycをドライバーとする発がん誘導モデルの構築と応用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奥田 晶彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 145
3. 書名 実験医学 2018年3月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/read0137364 researchmap https://researchmap.jp/read0137364/?lang=japanese
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Alabama at Birmingham			