

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16079

研究課題名（和文）リンパ系腫瘍におけるエピジェネティック遺伝子異常の役割に関する網羅的な検証

研究課題名（英文）Comprehensive functional analysis of epigenetics-related genetic alterations in lymphoid malignancies

研究代表者

古屋 淳史（Koya, Junji）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所分子腫瘍学分野・主任研究員

研究者番号：30748257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ゲノム編集技術を用いて、in vivoでリンパ腫発症に寄与するエピジェネティック関連遺伝子異常について網羅的スクリーニングを行った。リンパ腫臨床検体で異常が認められるエピジェネティック関連遺伝子を対象としたライブラリーを用いた骨髄移植実験によって、欠失することによってリンパ腫を発症する新規エピジェネティック関連遺伝子が複数同定された。さらに腫瘍免疫関連遺伝子の異常とライブラリースクリーニングを組み合わせることで、リンパ腫発症率が上昇することが明らかとなった。本研究により、網羅的腫瘍発症スクリーニング法の開発とエピジェネティック関連遺伝子異常によるリンパ腫発症機構の理解を進めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のがんゲノム解析技術の進歩によって、さまざまながん種における遺伝子異常プロファイルが明らかにされてきたが、実際にどの遺伝子異常が腫瘍の発症や維持に生体内で寄与しているかはほとんど明らかになっていない。そこで、遺伝子編集技術を用いた腫瘍発症スクリーニング法を開発し、悪性リンパ腫で認められている遺伝子異常について網羅的に検証を行った。その結果、欠失することによって悪性リンパ腫を発症する新規の遺伝子を同定することができた。この手法は他のさまざまな疾患に応用することが可能であり、きわめて学術的意義および社会的意義が高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：I performed CRISPR library screening to elucidate the contribution of epigenetics-related genetic abnormalities to the development of malignant lymphoma in vivo. Bone marrow transplantation assay using lymphoma-related library identified novel epigenetics-related genes whose deletion cause malignant lymphoma. Furthermore, by combining with immune-checkpoint abnormality, the incidence of malignant lymphoma caused by epigenetics-related gene alteration was increased. This study developed novel screening method and clarified the actual driver epigenetics-related gene alterations for lymphoma development in vivo.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：悪性リンパ腫 スクリーニング 遺伝子編集 マウスモデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は遺伝子異常やウイルス感染を原因とする腫瘍であり、本邦では新規年間罹患者が1万5000人を超えており、高齢化に伴い増加傾向にある疾患である。悪性リンパ腫はB細胞性、T細胞性、NK細胞性の分類をはじめとして、それぞれの細胞系統についても、さまざまな分化段階の細胞を起源として発症する疾患であり、臨床的にも病理学的にも極めて多彩な疾患群である。予後についても化学療法のみでは治癒が得られない病型も多く含まれており、それぞれの悪性リンパ腫の病態に応じた副作用の少ない薬剤の開発に向け、新規治療標的の同定が渴望されている。

近年、次世代シーケンスやマイクロアレイ技術の発達により、数多くの悪性腫瘍の遺伝子異常の全体像が解明されてきた（B Vogelstein, Science, 2013）。造血器腫瘍領域においても、数多くの遺伝子異常の存在が報告されているが、その中でも近年非常に注目を集めているのが、DNAメチル化やヒストン修飾を介して遺伝子の発現を制御しているエピジェネティック関連遺伝子の異常である（P Ntziachristos, Nat Immunol, 2016）。急性骨髄性白血病などの骨髄系腫瘍については、後述する申請者の研究をはじめとして、腫瘍の進展におけるエピジェネティック異常の役割は徐々に解明されてきている（J Koya, Nat commun, 2016）。一方で、悪性リンパ腫をはじめとするリンパ系腫瘍については、より多様なエピジェネティック関連遺伝子の異常が認められているにも関わらず（R Rosenquist, J Intern Med, 2017、RF Sandell, Curr Oncol Rep, 2017、K Kataoka, Nat Genet, 2015）多様であるがゆえに変異遺伝子やコピー数異常領域に含まれる遺伝子の悪性リンパ腫発症や進展における機能的役割はほとんど明らかではない。しかし、同定された新規遺伝子異常のひとつひとつについて生物学的な役割や機能を検証することは非常に労力を要するものであり、腫瘍化における役割をハイスループットに解析する方法を悪性リンパ腫領域で確立することは、さまざまながん種の研究においても極めて有用である。

近年、遺伝子の機能異常を調べる方法として、ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9 sgRNAライブラリーが注目されている。この方法は従来のshRNAの場合と比較して、ゲノム自体に挿入・欠失を導入して、遺伝子機能を永久的にノックアウトできる点や、発現カセットに内在されているバーコードのみでなく、ゲノム自体をシーケンスすることにより対象の遺伝子が実際にノックアウトされているかを検証可能な点で非常に優れている。そこで本研究ではこの技術を応用し、網羅的かつ短期間にin vivoで腫瘍の形成能を評価できる系を確立することを試みることとした。

2. 研究の目的

上述の通り、リンパ系腫瘍では、極めて多様なエピジェネティック関連遺伝子の異常が認められているにも関わらず、それらが悪性リンパ腫発症や進展に果たしている機能的役割はほとんど明らかではない。そこで本研究はリンパ腫臨床検体で認められる多様な遺伝子異常について、特にエピジェネティック異常に焦点を当てて、網羅的かつ短期間にin vivoで腫瘍の形成能を評価できる系を確立し、リンパ腫の病態における機能的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エピジェネティック関連遺伝子をターゲットとしたCRISPR/Cas9ライブラリーの作製

これまでのsgRNAライブラリーを用いたがん研究の多くは、数千から数万の遺伝子を標的とする網羅的なライブラリーを用いて、in vitroにおける細胞株の増殖などを評価して行われてきたが、この方法では遺伝子あたりのsgRNA数の少なさに起因する実験精度の低さや、in vivoにおける重要性を評価不能という問題点があった。

そこで本研究では、これまでにリンパ腫臨床検体において同定されたエピジェネティック関連遺伝子の異常に限定して、1遺伝子あたりのsgRNA数を増やしたカスタムライブラリーを作製し、Cas9を恒常的に発現するマウスの造血幹前駆細胞に導入して骨髄移植実験を行った。（図1）

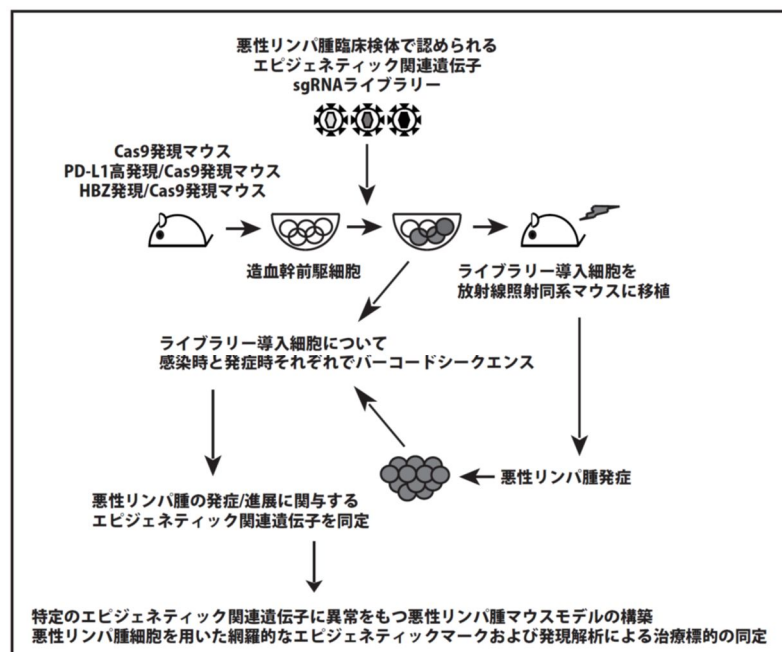


図1. リンパ系腫瘍におけるエピジェネティック遺伝子異常の役割に関する網羅的な検証法

(2) 野生型マウスを用いたリンパ腫発症に寄与するエピジェネティック異常の同定

このエピジェネティック関連遺伝子 sgRNA ライブラリーを Cas9 発現マウスの造血幹前駆細胞に導入し、同系マウスに移植することでリンパ腫が発症した場合には、表面マーカーや病理組織などを調べることによって表現型を明らかにするとともに、sgRNA 毎に挿入されたバーコードのアンプリコンシーケンスや、sgRNA ライブラリーの標的である遺伝子自体の標的シーケンスを実施して、発症したリンパ腫で濃縮されている sgRNA を同定することでエピジェネティック異常を持つマウスリンパ腫モデルを構築した。

(3) 低～中頻度にリンパ腫を発症することが期待される遺伝子改変マウスにおける解析

通常リンパ腫は 1 つの遺伝子異常で発症するわけではないため、免疫チェックポイント分子異常マウスなどの低～中頻度にリンパ腫を発症することが期待される遺伝子改変マウスを用いて、腫瘍化を促進するエピジェネティック関連遺伝子異常の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) リンパ腫関連 CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーの作成

まずリンパ腫臨床検体で異常が認められるエピジェネティック関連遺伝子である BCOR, DNMT3A, EP300, TET2 などを含む 80 遺伝子について、マウスにおける相同遺伝子に対して 12 個ずつの sgRNA を含んだ sgRNA ライブラリーを Gibson Assembly 法を用いてレンチウイルスベクターにクローニングを行った。作成した sgRNA ライブラリーについて、sgRNA 配列部位を PCR 増幅し、次世代シーケンサーを用いて各 sgRNA の含まれている割合を解析したところ、90/10 パーセントアイル比が 2.12 という結果であり、それぞれの sgRNA が偏りなく含まれていることが確認できた。

(2) リンパ腫関連 sgRNA ライブラリーによる造血器腫瘍の発症

この sgRNA ライブラリーを tagRFP 蛍光タンパクでラベルしたレンチウイルスにより Cas9-GFP を恒常的に発現しているマウスから純化した造血幹前駆細胞に導入し、5,000 個の感染細胞を 1×10^5 個の正常骨髓細胞とともに致死量放射線を照射した同系マウスに骨髓移植を行い、造血細胞のみに遺伝子異常を導入する系を確立した。1 カ月後の末梢血解析により感染細胞の生着を確認し、以後は末梢血のキメリズム解析および超音波検査による脾腫の評価にて経過観察を行った。その結果、骨髓移植後 3 カ月後より sgRNA ライブラリーを導入したマウスにさまざまな種類の造血器腫瘍を発症しはじめ、1 年半の経過によって 8 割程度のマウスが何らかの造血器腫瘍を発症することを明らかにした。(図 2)

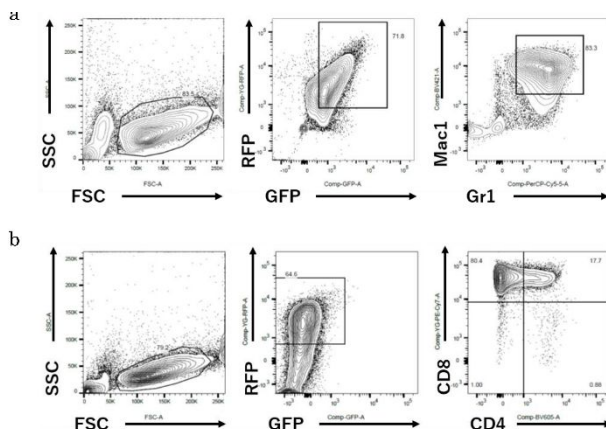


図 2. sgRNA ライブラリーによって発症したマウス造血器腫瘍のフローサイトメトリ解析

a) 移植後 83 日に急性骨髄性白血病で死亡したマウスの骨髓細胞解析。骨髓球系マーカーを発現している。

b) 移植後 105 日に悪性リンパ腫で死亡したマウスの脾臓細胞解析。T 細胞マーカーである CD8 を発現している。

一方でコントロールとしての sgRNA を含まない空のウイルスベクターを導入したマウスでは同時期における死亡は全く認められなかったことから、sgRNA ライブラリー由来の遺伝子異常がマウス個体に何らかの疾患を引き起こしているものと考えられた。さらに、この腫瘍細胞を用いて濃縮された sgRNA の同定を行ったところ、Kmt2d や Tet2 といった既に遺伝子欠失によるマウス造血器腫瘍モデルが作製されている遺伝子に加え、欠失によって複数のマウスで造血器腫瘍を発症する新規のエピジェネティック関連遺伝子が見出された。

(3) 免疫チェックポイント分子異常マウスを用いた sgRNA ライブラリースクリーニング

さらにリンパ腫臨床検体で異常を高頻度に認めるものの、その異常単体ではマウス個体にリンパ系腫瘍を発症しない免疫チェックポイント分子遺伝子改変マウスの造血幹前駆細胞を用いて同様の実験を行うと、全体の造血器腫瘍の発症率や潜時期間、濃縮されていた sgRNA の種類はほとんど変わらないにも関わらず、リンパ系腫瘍の発症頻度が高くなるという結果が得られた。実際にこの疾患表現型の変化は、複数のエピジェネティック関連遺伝子について見られており、リンパ腫関連遺伝子異常とエピジェネティック関連遺伝子異常の相互作用によるリンパ腫発症機構を明らかにした。

以上の研究成果は、今回開発した本研究手法が造血器腫瘍の発症に重要な遺伝子異常を *in vivo* でハイスループットに解析するための強力なツールであることを示しているものであり、他疾患への応用が期待されるものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----