

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03795

研究課題名（和文）中枢神経系悪性リンパ腫の腫瘍内多様性と微小環境解析による病態発生の解明と治療開発

研究課題名（英文）Investigation of tumor heterogeneity and microenvironment of primary central nervous system lymphoma and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

永根 基雄（Nagane, Motoo）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60327468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系原発悪性リンパ腫（PCNSL）は全身性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）とは異なる遺伝子異常パターンを示すが、その相違・相同性については未解決である。今回、PCNSLと全身性DLBCLの比較を通じ、シングルセル解析によりPCNSLの腫瘍内多様性と腫瘍微小環境の特徴を解析した。DLBCL 18例、PCNSL 16例の腫瘍検体を解析し、PCNSLの腫瘍微小環境ではT/NK細胞と骨髄系細胞が増加、正常B細胞と形質細胞様樹状細胞が減少、PCNSLで増加するCD8陽性T細胞分画が解糖系の低下やストレス応答の亢進を示し、DLBCLと微小環境が顕著に異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNSLと全身性DLBCLの腫瘍内多様性と微小環境の詳細な違いを明らかにしたことで、これらの疾患の発生機序や治療戦略の理解が深まり、PCNSLに対する標的細胞や分子なども含め、新たな治療法開発への基盤を提供する。

研究成果の概要（英文）：Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) exhibits a different pattern of genetic abnormalities compared to systemic diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), but the differences and similarities between them remain unresolved. In this study, we analyzed the tumor heterogeneity and tumor microenvironment of PCNSL through single-cell analysis in comparison to systemic DLBCL. We analyzed tumor samples from 18 cases of DLBCL and 16 cases of PCNSL. In the tumor microenvironment of PCNSL, there was an increase in T/NK cells and myeloid cells, and a decrease in normal B cells and plasmacytoid dendritic cells. Additionally, the CD8-positive T-cell fraction, which increased in PCNSL, showed decreased glycolysis and enhanced stress response, suggesting that the microenvironment in PCNSL is markedly different from that in DLBCL.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：中枢神経系悪性リンパ腫 シングルセル解析 腫瘍内多様性 微小環境解析 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に原発する悪性リンパ腫(Primary Central Nervous System Lymphoma, PCNSL)は浸潤性に脳脊髄実質内を増殖する致死的疾患である。我々のグループは PCNSL の包括的遺伝子解析を施行し、全身性のびまん性大型 B 細胞リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) と異なる特徴的遺伝子異常パターンを報告した。しかし、PCNSL を全身性 DLBCL と異なる疾患概念として捉えるか、全身性 DLBCL の一部として捉えるかということについては、依然として結論は出ていない。

この問題が従来からの遺伝子解析では未解決である理由として、第一に、腫瘍内多様性を考慮したアプローチが必要であると考えられる。DLBCL は一つの腫瘍内に異なる遺伝学的プロファイルを有する複数のサブクローンを持つ、即ち腫瘍内多様性を有する腫瘍である (Morin RD, Blood 2013; Scherer F, Sci. Transl. Med. 2016)。PCNSL においても、全身性 DLBCL と同様に腫瘍内多様性を有することが予想されるが、従来からの PCNSL における遺伝子解析では腫瘍内多様性を考慮した包括的検討はこれまで行われていない。PCNSL と全身性 DLBCL の分子遺伝学的プロファイルを詳細に比較し、その差異あるいは同一性を明らかにするためには、腫瘍内のそれぞれのサブクローンが依存する遺伝子異常やシグナル伝達経路を詳細に解析することが必要と考えられる。第二に、PCNSL の腫瘍微小環境内の非腫瘍細胞に関する検討が必要と考えられる。これまでの PCNSL の腫瘍微小環境の検討としては、腫瘍随伴マクロファージの検討が複数報告されているが (Komohara, J Clin Exp Hematop. 2011; Sasayama T, Brain Pathol 2016; Nam SJ, Oncoimmunology 2018)、遺伝学的アプローチによる検討は行われていない。以上に挙げた腫瘍内多様性、ならびに腫瘍微小環境の非腫瘍細胞の生物学的意義については、従来からの遺伝子解析のアプローチでは腫瘍検体として採取した臨床検体に含まれる腫瘍細胞、非腫瘍細胞を一塊として解析するため、検討することが困難であった。

近年、腫瘍検体を一塊として解析するのではなく、個々の腫瘍細胞や腫瘍随伴免疫担当細胞を 1 細胞毎に分離した上でそれぞれの細胞における遺伝子解析を行うシングルセル解析の手法が開発され、複数の腫瘍において病態の解明の一助となっている (Venteicher AS, Science 2017)。シングルセル解析は腫瘍内多様性を有する腫瘍細胞だけでなく、腫瘍微小環境内の非腫瘍細胞の遺伝子発現パターンを解析する事も可能である。

また、DLBCL の中で中枢神経浸潤を生じるためのドライバー遺伝子異常は未だ同定されておらず、中枢神経系での腫瘍形成に関与する変異探索は病態解明に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では PCNSL において初めてシングルセル解析を行うことで、PCNSL の腫瘍内多様性と腫瘍微小環境を特に全身性 DLBCL との比較において特徴づけることを目的とする。また二次性 CNSL (SCNSL) における特徴的な遺伝子変異についても機能解析を行い、これらの遺伝子変異と DLBCL の中枢神経系浸潤との関連についても検討を行うことも検討する。

## 3. 研究の方法

我々は、10X Genomics 社の Chromium システムを応用して、多数の表面マーカー解析とト

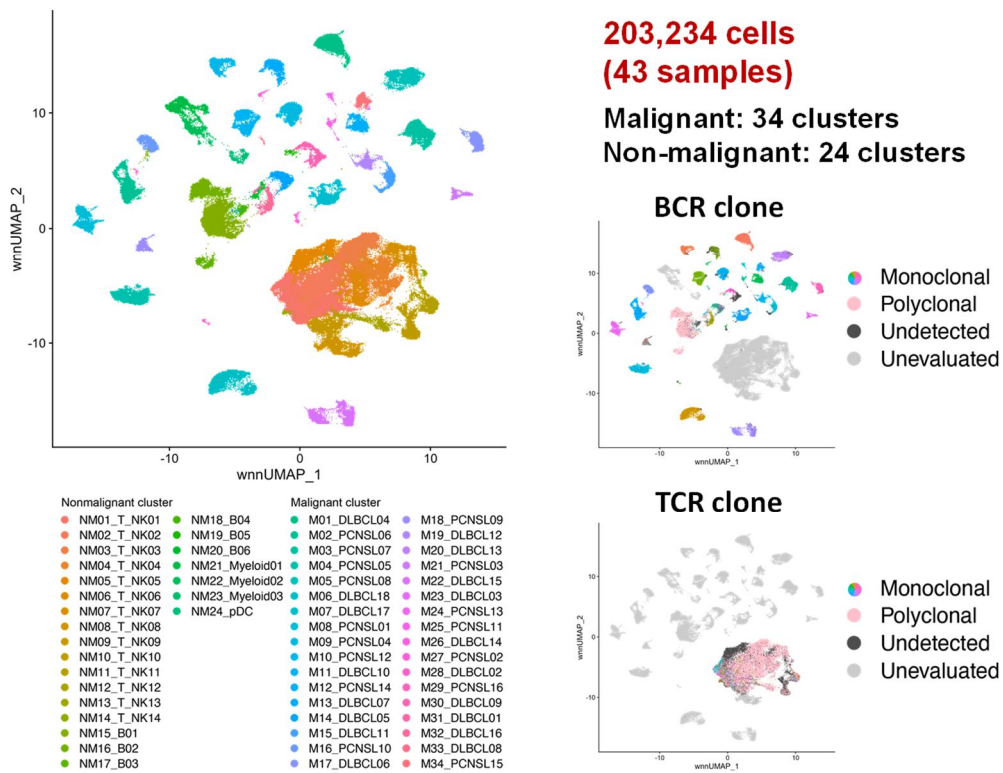
ランスクリプトーム解析・TCR/BCR レパトア解析を単一細胞レベルで同時に実現できる技術を開発している。本研究では、本技術を用いて杏林大学脳神経外科及び関連施設の PCNSL 例（20～30 例）を対象とし、同一単一細胞からこれらのマルチオミクス解析データを取得した。

具体的には、骨髄系、T 細胞系、B 細胞系などに特徴的な表面マーカーを認識する 80～100 種類のオリゴヌクレオチドを結合させた抗体で染色した後、10X Genomics の単一細胞トランスクリプトーム解析および B 細胞や T 細胞に対する単一細胞レパトア解析によりライブラリ作成を行い、次世代シーケンサーにより解読した（CITE-seq）。得られたデータは Cell Ranger アルゴリズムによりマッピング、遺伝子発現カウント、B・T 細胞受容体カウントを行った後に、遺伝子発現、表面マーカー、および、レパトア解析を実施した。さらに、Seurat アルゴリズムを用いて、遺伝子発現と表面マーカーの統合的な解析も実施する。その結果得られたマルチオミクス解析データを用いて、まず腫瘍細胞分画（モノクローナルな BCR/TCR 再構成により判定）において mRNA や表面マーカー発現の不均一性を評価した。さらに、tSNE や主成分分析を用いて細胞集団を同定し、各細胞集団の特徴を明らかにした。同時に腫瘍微小環境を構成する細胞の割合および性質の変化について検討した。これらの結果について、正常（末梢血またはリンパ節）と腫瘍検体の比較や DLBCL と PCNSL との比較を行った。これらを通して、腫瘍内多様性と腫瘍微小環境内の非腫瘍細胞を考慮した上で、PCNSL の特徴を明らかにし、DLBCL との共通点・相違点について解明することを目指した。

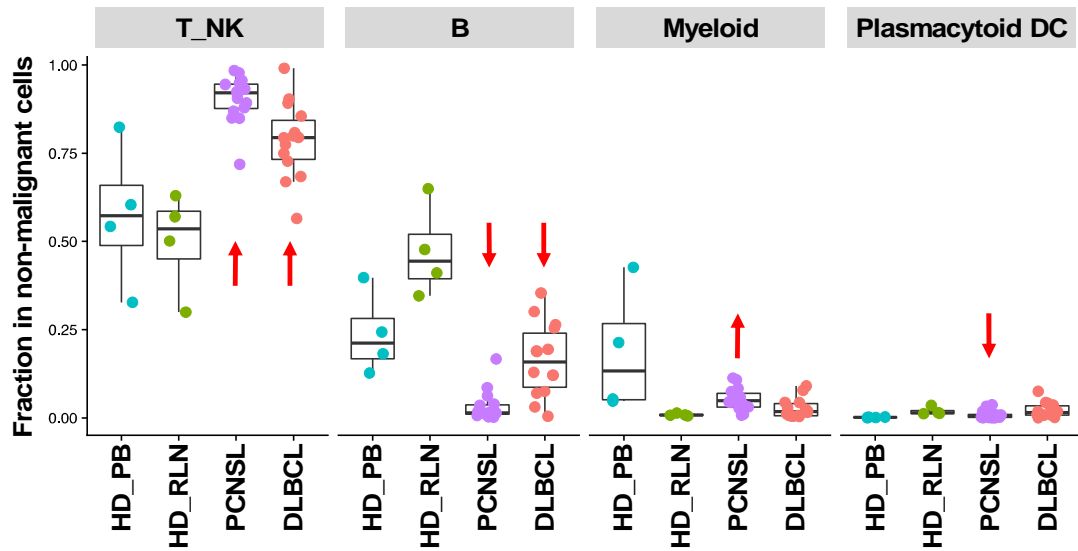
また、SCNSL における特徴的な変異を来している候補遺伝子に対して発現ベクターを作成し、遺伝子プロファイルを解析したリンパ球・リンパ腫細胞株等に導入することで、下流シグナルの変化や形質転換の有無を増殖能・造腫瘍性等によって腫瘍形成にかかる生物学的意義を比較検討する。

#### 4．研究成果

DLBCL 18 例、PCNSL 16 例から得られた腫瘍検体の単一細胞マルチオミクス解析データを取得した。コントロールとして健常人ドナーの末梢血 4 例、反応性リンパ節 5 例を加えて、合計約 20 万細胞の解析を実施した。トランスクリプトームおよび表面マーカーを用いた WNN クラスタリングの結果、24 個の非腫瘍細胞クラスター（T/NK 細胞：14 個、B 細胞：6 個、骨髄系細胞：3 個、形質細胞様樹状細胞：1 個）と 34 個の腫瘍細胞クラスターの合計 58 個のクラスターが同定された（図）。さらに、各系統に特徴的な表面マーカーおよび mRNA 発現から細胞系統が決定された。非腫瘍細胞分画は、各クラスターに様々な検体由来の細胞が混在していたが、腫瘍細胞分画は各症例由来の細胞が個々にクラスターを形成した。腫瘍細胞分画では、各クラスターにおいて単クローン性の BCR が認められ、腫瘍細胞であることが確認された。一方、T/NK 細胞分画では多クローン性の TCR クローン拡大が認められた。

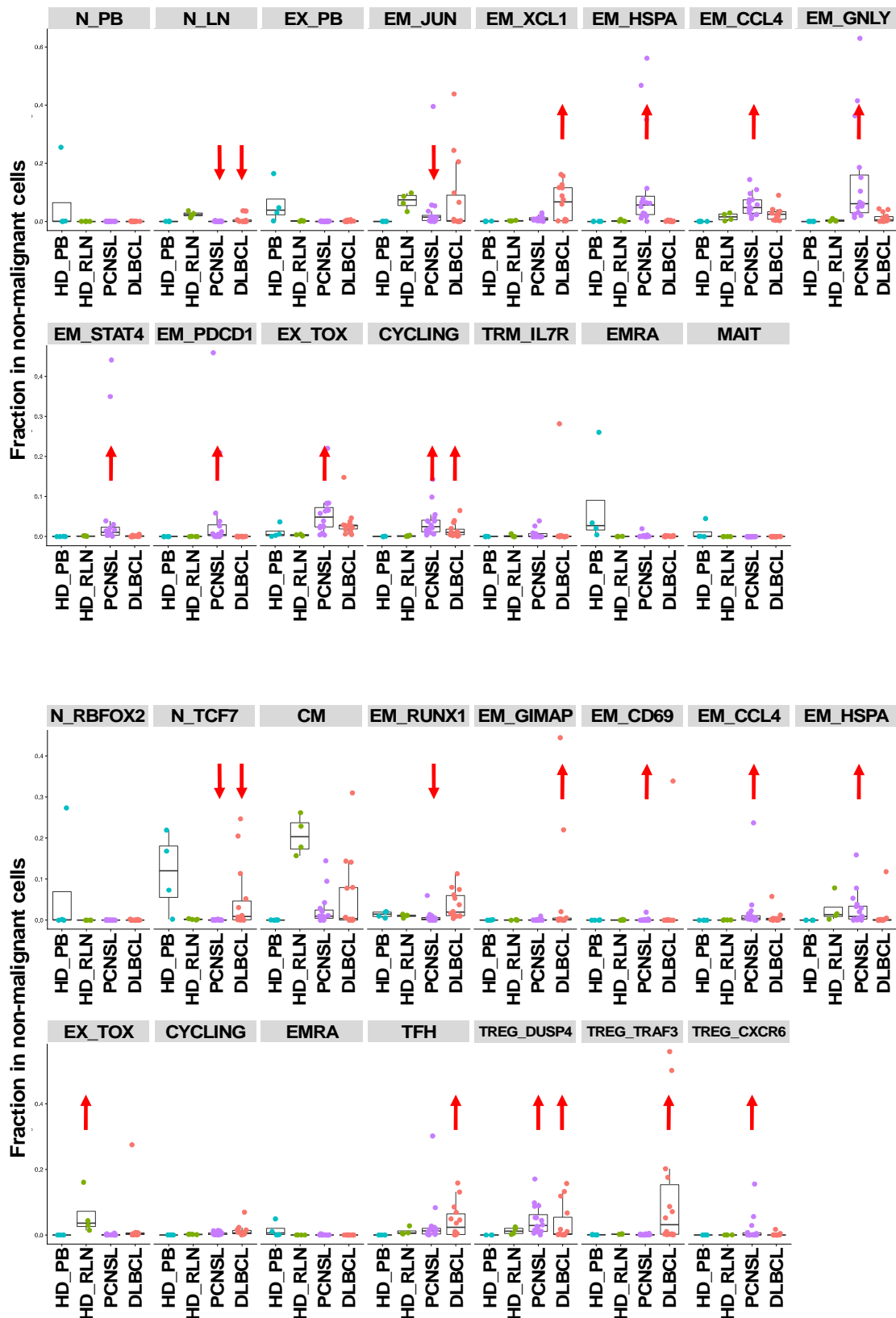


次に、腫瘍微小環境を構成する細胞を解析した。非腫瘍分画における割合を評価すると、DLBCL では T/NK 細胞の増加、正常 B 細胞の低下が認められた。一方、PCNSL では、T/NK 細胞、骨髄系細胞の増加、正常 B 細胞、形質細胞様樹状細胞の低下が認められた( 図 )。



さらに、T/NK 細胞分画においてリクラスタリングを行い、さらに CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞に分けてリクラスタリングを行うと、CD4 陽性 T 細胞が 15 個のクラスター、CD8 陽性 T 細胞が 15 個のクラスターが認められた( 図 )。CD8 陽性 T 細胞分画では、複数のエフェクター/メモリー細胞分画および疲弊細胞分画が PCNSL で増加を認めた。一方で、CD4 陽性 T 細胞分画では、濾胞性ヘルパー T 細胞や制御性 T 細胞が DLBCL で増加を認めた。また、TCR により T 細胞分画のクローン増殖の程度を評価すると、DLBCL と PCNSL の両方でクローン増殖の増加を認めたが、PCNSL において顕著であった。さらに、PCNSL で増加している CD8 陽性 T 細胞分画は、解糖系などの ATP 産生経路の低下やストレス応答反応の亢進などの特徴的な表現型を示した。これらの結果は、DLBCL と PCNSL

は、同様の腫瘍であるにもかかわらず、発生部位が異なることにより、顕著に異なる微小環境を呈することを示唆している。



SCNSL における特徴的な遺伝子変異に関する解析研究については、研究期間中に COVID-19 による共同研究者との調整、研究の実施が困難な環境があり、本研究期間内に予備実験を開始し、研究成果を得る段階には至らなかった。引き続き次期研究課題として研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keisuke Kataoka                             |
| 2. 発表標題<br>Single-cell analysis of DLBCL and PCNSL     |
| 3. 学会等名<br>The 13th JSH International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                 | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 立石 健祐<br>(Tateishi Kensuke)<br>(00512055) | 横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授<br><br>(22701)  |    |
| 研究分担者 | 市村 幸一<br>(Ichimura Koichi)<br>(40231146)  | 順天堂大学・医学部・特任教授<br><br>(32620)   |    |
| 研究分担者 | 富山 新太<br>(Tomiyama Arata)<br>(40385810)   | 防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院脳神経外科・講師<br><br>(82406) |    |
| 研究分担者 | 片岡 圭亮<br>(Kataoka Keisuke)<br>(90631383)  | 国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長<br><br>(82606)                                     |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 佐々木 重嘉<br><br>(Sasaki Nobuyoshi)<br><br>(20894504) | 杏林大学・医学部・助教<br><br><br><br>(32610) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |