

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17415

研究課題名(和文)悪性リンパ腫の病態形成においてPD-L1異常が果たす機能的役割の解明

研究課題名(英文)Functional role of PD-L1 alteration in the pathogenesis of malignant lymphoma

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・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):本研究は、我々が独自に開発した細胞系列特異的にPd-L1遺伝子異常を導入したモデルマウスや、ゲノム編集技術を応用することで多数の遺伝子異常について造腫瘍能を高効率に生体内でスクリーニングできる方法を用いて、PD-L1ゲノム構造異常が悪性リンパ腫の発症および維持にどのような機能的役割を果たしているか明らかにすることを目的とした研究である。本研究の遂行によって、正常の各リンパ球サブセットにおいてPD-L1が果たしている機能的役割や、PD-L1異常を有する悪性リンパ腫の免疫学的表現型の特徴や、悪性リンパ腫の発症においてPD-L1異常と協調する遺伝子異常などが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、70種類以上の病型が存在し、それぞれに特徴や予後が異なっていることから、病型に応じた新規治療標的の同定や治療法の確立が望まれている。我々は免疫チェックポイント分子のひとつであるPD-L1のゲノム構造異常が悪性リンパ腫において認められることを明らかにしてきたが、本研究では、モデルマウスや最新ゲノム編集技術を駆使することで、PD-L1の正常リンパ球における役割や、PD-L1異常を伴う悪性リンパ腫の特徴を明らかにした。この技術は他遺伝子にも応用可能であり、今後の遺伝子異常に応じた治療法の開発研究に貢献する。

研究成果の概要(英文):This study aims to elucidate the functional role of PD-L1 genomic structural variation in the development of malignant lymphomas by using a genetically-engineered mouse model and a high-throughput in vivo screening technology. The results have elucidated:

1. The functional role of PD-L1 in each normal lymphocyte subset.
2. The immunophenotypic features of malignant lymphomas with PD-L1 genomic structural variation and the additional genetic abnormalities that cooperate with PD-L1 alteration in the development of malignant lymphomas.

研究分野：造血器腫瘍の病態解析

キーワード：PD-L1 免疫チェックポイント分子 ゲノム編集 生体スクリーニング 悪性リンパ腫

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3万人を超えており、高齢化に伴い増加傾向にある疾患である。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、副作用の少ない薬剤の開発に向け、各病型に応じた病態の網羅的理解および新規治療標的の同定が渴望されている。

近年、悪性腫瘍の遺伝子異常において、免疫チェックポイント分子の異常が注目を集めている。申請者の所属研究室では、*PD-L1* ゲノム構造異常が一部の悪性リンパ腫を中心に非常に高頻度に認められることを明らかにしてきた (K Kataoka, *Nature*, 2016, K Kataoka, *Leukemia*, 2019)。*PD-L1* 異常による腫瘍形成能については、PD-1/PD-L1 シグナルの亢進による細胞障害性 T 細胞の不活性化を介した腫瘍免疫からの回避機構が固形腫瘍などで想定されているが、そもそも免疫細胞であるリンパ球を起源とする悪性リンパ腫においても同じ機構が当てはまるかは明らかになっていない。特に、この *PD-L1* ゲノム構造異常は B 細胞リンパ腫、T 細胞リンパ腫の両者で高頻度に認められており、異なるリンパ球サブセットにおいて PD-L1 が同じ機能を果たしているかも全く分かっていない。

さらに、悪性リンパ腫の発症および維持には *PD-L1* の異常以外に付加的なゲノム異常が必要であると考えられるが、どのような付加的な異常が実際に生体内において *PD-L1* 異常と機能的に協調するかも明らかになっていない。

本研究では、申請者らが開発した *PD-L1* のゲノム構造異常を再現したマウスモデルを用いることで上記の課題を解決することが可能である。さらには免疫チェックポイント分子異常を伴う悪性リンパ腫マウスモデルが作出され、細胞障害性 T 細胞のみならず、すべての腫瘍免疫微小環境に関する詳細な解析や、免疫チェックポイント阻害薬による腫瘍免疫賦活化機構、さらにはその耐性化機構などについて統合的な理解が可能となる。

2. 研究の目的

本研究は悪性リンパ腫臨床検体で認められる *PD-L1* ゲノム構造異常に焦点を当てて、我々が独自に開発した病態再現マウスモデルおよび生体内高効率造腫瘍能スクリーニング法を用いることで、悪性リンパ腫の病態形成における *PD-L1* ゲノム構造異常の機能的役割を網羅的に解明することを目的とした。具体的には以下の2点である。

- (1) *Pd-11* 遺伝子改変マウスを用いた各リンパ球サブセットにおける Pd-11 機能解析
- (2) 悪性リンパ腫の発症において *Pd-11* ゲノム構造異常と協調する機能喪失型異常の同定とその機能解析

3. 研究の方法

- (1) *Pd-11* 遺伝子改変マウスを用いた各リンパ球サブセットにおける Pd-11 機能解析

各リンパ球分画において *Pd-11* が果たしている機能的役割を明らかにする目的に、ヒト悪性リンパ腫臨床検体で見出される *PD-L1* ゲノム構造異常を再現した *Pd-11* 3'UTR 条件の欠失マウスを用いた。具体的には、*PD-L1* ゲノム構造異常は B 細胞や CD4T 細胞を起源とする悪性リンパ腫の患者検体で高頻度に認められていることから、CD19/Aicda-Cre(B 細胞)、CD4-Cre(CD4T 細胞)などのトランスジェニックマウスと交配し、末梢血や脾臓から得られた単核球の免疫表現型解析を行うことで、各リンパ球分画において Pd-11 が果たしている機能的役割を明らかにする。

- (2) 悪性リンパ腫の発症において *PD-L1* ゲノム構造異常と協調する機能喪失型異常の同定とその機能解析

悪性リンパ腫の発症において、*PD-L1* 異常と協調する遺伝子異常を同定するために、*PD-L1* ゲノム構造異常を高頻度に伴う悪性リンパ腫で高頻度に認められる機能喪失型もしくは機能不明の遺伝子異常を対象にした sgRNA ライブラリーを作成し、*Pd-11* 3'UTR 欠失/*Cas9* 発現マウス由来の造血幹前駆細胞にレンチウイルスを用いて導入し、同系マウスに移植を行った。レシピエントマウスが悪性リンパ腫を発症した際に、濃縮されている sgRNA を同定することで、*Pd-11* 異常と協調して悪性リンパ腫の発症に寄与する遺伝子異常を明らかにした。さらにフローサイトメトリー解析によって、*Pd-11* ゲノム構造異常がもたらす *Pd-11* の高発現によって、腫瘍免疫微小環境がよってどのように変化するか検証する。さらに、PD-L1 阻害薬などの免疫チェックポイント阻害薬の投与によって変化がキャンセルされ、治療効果が得られるか検証を行う。

4. 研究成果

(1) *Pd-11* 遺伝子改変マウスを用いた各リンパ球サブセットにおける *Pd-11* 機能解析

まず *PD-L1* が正常造血細胞において *in vivo* で果たしている役割を明らかにするために、我々が作製した *Pd-11* 3'UTR 条件的欠失マウスを poly (I) poly (C) の投与によって Cre を発現する Mx1-Cre トランスジェニックマウスと交配 (CD45.2 背景) し、CD45.1 マウスに骨髓細胞の移植を行った。移植後に poly (I) poly (C) を投与することで、Mx1-Cre アリルを有するマウスでは *Pd-11* 3'UTR の欠失が導入されることで *Pd-11* の発現が造血細胞全般で上昇し、ヒト悪性リンパ腫臨床検体で認められた現象が再現されていることを確認できた。一方で、その上昇の程度はリンパ球分画によって 1.5 倍から 10 倍までの幅があることが明らかとなり、各リンパ球における *Pd-11* の機能や重要性の違いが示唆された。

また、*Pd-11* の発現上昇によって脾臓における胚中心 B 細胞は減少する一方で、T 細胞依存性抗原である NP-KLH で刺激を行うと、B 細胞中の特定分画の割合が増加することが明らかとなり、*PD-L1* のゲノム構造異常によって特定の B 細胞分画が選択増幅されることが腫瘍形成に関与している可能性が考えられた (図 1)。

この表現型が B 細胞と T 細胞のどちらの *Pd-11* 発現上昇によるものであるかを明らかにする目的に、この *Pd-11* 遺伝子改変マウスを CD19-Cre および CD4-Cre トランスジェニックマウスと交配し、B 細胞および T 細胞それぞれの細胞系列特異的に *Pd-11* ゲノム構造異常を導入したマウスを作製した。その結果、B 細胞系列に *Pd-11* ゲノム構造異常を導入した場合にのみ上記の表現型が再現され、B 細胞における *Pd-11* の高発現が、B 細胞中の特定分画の増加に寄与していることが明らかとなった。

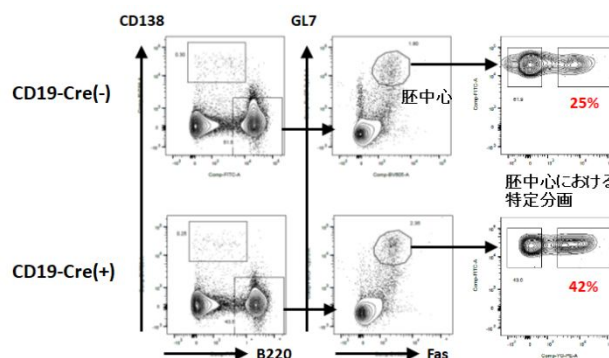


図 1. B 細胞特異的な *Pd-11* 3'UTR 欠失による B 細胞胚中心中の特定分画増加

(2) 悪性リンパ腫の発症において *Pd-11* ゲノム構造異常と協調する機能喪失型異常の同定とその機能解析

まず、申請者が開発したゲノム編集技術を応用した生体内高効率造腫瘍能スクリーニング法を行うために、*PD-L1* ゲノム構造異常を高頻度に伴う悪性リンパ腫 (成人 T 細胞白血病リンパ腫、節外性 NK/T 細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、原発性縦隔大細胞型 B 細胞リンパ腫) で高頻度に認められる機能喪失型もしくは機能不明の遺伝子異常を対象にした sgRNA ライブラリー (80 遺伝子、12 sgRNA/遺伝子) を作成した。次に、作成した sgRNA ライブラリーベクターの sgRNA 配列部位を PCR 増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析を行い、各 sgRNA が偏りなく含まれていることを確認した。この sgRNA ライブラリーをレンチウイルスにより *Pd-11* 3'UTR 欠失/Cas9 発現もしくは Cas9 のみを発現するマウス由来の造血幹前駆細胞分画に導入し、致死量の放射線量を照射した同系マウスに骨髓移植を行い、この移植マウスの観察を長期にわたって観察した。すると、骨髓移植後 3 カ月後頃より sgRNA ライブラリーを導入したマウスの死亡が確認され、一方で空ベクターを導入したマウスでは死亡は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何らかの疾患を引き起こしているものと考えられた。実際に衰弱したマウスの形態学的、免疫学的解析を行ったところ、白血病やリンパ腫など、さまざまな種類の造血器腫瘍を発症していることが明らかとなった。*Pd-11* 3'UTR 欠失を背景にもつことで、より高率に造血器腫瘍を発症し、さらに興味深いことに、発症した造血器腫瘍の表現型は *Pd-11* 3'UTR 欠失を持つマウスでリンパ系腫瘍の割合が有意に高く、*Pd-11* 3'UTR 欠失がリンパ系腫瘍の病態形成に寄与していると考えられた (図 2)。

造血器腫瘍を発症したマウスの腫瘍細胞から採取したゲノム DNA を用いて、sgRNA 配列領域のシーケンスによって腫瘍細胞で濃縮されている sgRNA の同定をおこなったところ、*Pd-11* 3'UTR 欠失を有するマウスでのみ B 細胞リンパ腫の発症に寄与する sgRNA を同定し、*PD-L1* ゲノム異常と協調して生体内で B 細胞リンパ腫の発症に寄与する遺伝子異常を同定した。

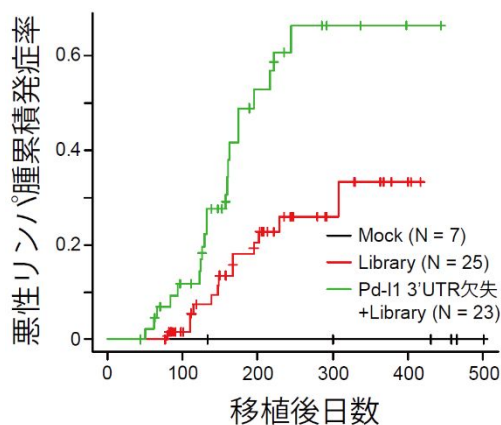


図 2. *Pd-11* 3'UTR 欠失による悪性リンパ腫発症の増加

このように本研究では正常造血、特に各リンパ球分画において Pd-11 が果たしている生物学的意義および *PD-L1* 異常関連悪性リンパ腫における重要な協調遺伝子異常の同定を通じた病態解析基盤の構築を完了することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 健太郎, 古屋 淳史, 吉藤 康太, 伊藤 勇太, 湯淺 光博, 斎藤 優樹, 田畑 真梨子, 新垣 清登, 木暮 泰寛, 大島 孝一, 片岡 圭亮
2. 発表標題 高効率スクリーニングによるリンパ腫関連遺伝子異常の生体内における造腫瘍能の網羅的解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 健太郎, 古屋 淳史, 吉藤 康太, 伊藤 勇太, 湯淺 光博, 斎藤 優樹, 田畑 真梨子, 新垣 清登, 木暮 泰寛, 大島 孝一, 片岡 圭亮
2. 発表標題 高効率スクリーニングによるリンパ腫関連遺伝子異常の生体内における造腫瘍能の網羅的解明
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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